



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**POTENSI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ALAMI  
PENCERNAAN IKAN KERAPU BEBEK (*Chromileptes altivelis*  
Valencines, 1828) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PAKAN  
IKAN**

**TESIS**



**OLEH**

**DIAN MAYASARI  
1121208013**

**PROGRAM  
PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG, 2013**

**POTENSI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ALAMI  
PENCERNAAN IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*  
Valencines, 1828) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PAKAN  
IKAN**

**Oleh : Dian Maya Sari**

**(Dibawah bimbingan Dr.phil.nat Periadnadi dan Dr.phil.nat Nurmiati)**

**RINGKASAN**

Ikan Kerapu Tikus atau juga biasa dikenal dengan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) merupakan ikan buas yang hidup di dasar laut. Ikan ini memiliki bentuk tubuh agak pipih dan berwarna dasar abu-abu dengan bintik-bintik hitam di seluruh permukaan tubuh. Sekarang ini ikan Kerapu Bebek mulai dikembangkan dalam usaha budidaya. Pakan merupakan faktor yang berperan penting dalam usaha budidaya perikanan karena berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kesehatan ikan. Untuk efisiensi pakan banyak para pengusaha budidaya menambahkan antibiotik buatan. Namun dari beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya penggunaan antibiotik buatan banyak mendatangkan dampak negatif, diantaranya bertambahnya penyakit patogenik karena meningkatnya resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik. Untuk itu sekarang ini banyak penelitian yang mengisolasi bakteri alami sebagai kandidat probiotik. Namun pengetahuan tentang potensi dan karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) sebagai kandidat probiotik pakan ikan

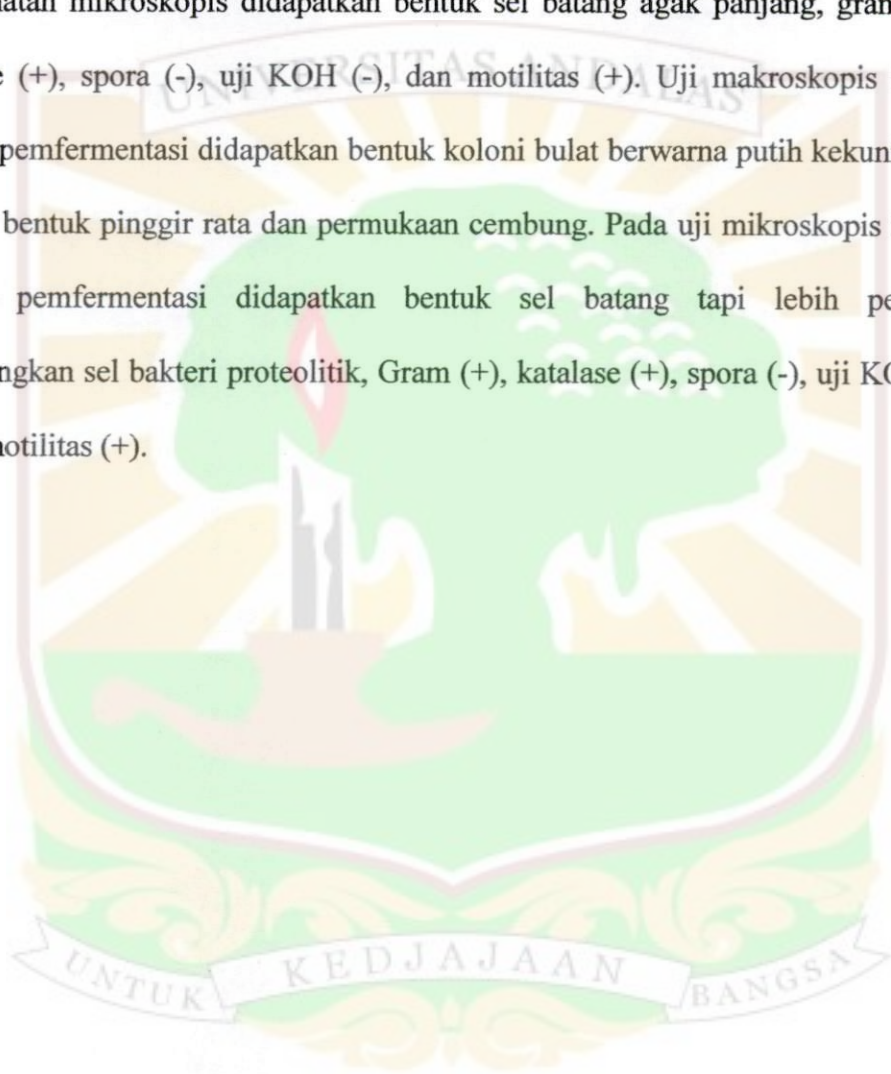
masih sedikit sehingga dilakukan penelitian ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan bakteri alami yang didapat dari pencernaan ikan Kerapu Bebek, mengetahui potensi bakteri alami yang didapat dari pencernaan ikan Kerapu Bebek serta melihat karakteristik isolat bakteri alami yang didapat dari pencernaan ikan Kerapu Bebek yang digunakan sebagai kandidat probiotik pakan ikan.

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Desember 2012 sampai Februari 2013 dilaboratorium Riset dan Mikrobiologi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas dengan menggunakan metoda eksperimen dan data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan dua jenis bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek, yaitu bakteri proteolitik (dalam medium Skim Milk Agar) dan bakteri pemfermentasi (dalam medium GTA+CaCO<sub>3</sub>) dengan perbandingan proporsional 3:1. Kedua isolat bakteri tersebut dilakukan uji makroskopis dan mikroskopis serta melihat potensi pada kedua jenis isolat bakteri tersebut. Bakteri proteolitik memiliki potensi Indeks Proteolitik (IP) 11,5 dengan kurva pertumbuhan bakteri proteolitik tertinggi terjadi pada jam ke-24 yaitu 12,75 dan aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-24 yaitu 50,66 µg/ml dengan pH rata-rata 5. Sedangkan bakteri pemfermentasi memiliki potensi Indeks fermentatif (10,5), indeks amilolitik (9), dan Indeks Selulolitik (2) kurva pertumbuhan bakteri pemfermentatif tertinggi terjadi pada jam ke-30 yaitu 12,61 dengan aktivitas enzim amilase lebih tinggi dibandingkan selulase. Aktivitas enzim amilase



tertinggi terjadi pada jam ke-22 yaitu 0,969 pH rata-rata 4. Aktivitas enzim selulase puncaknya terjadi pada jam ke-20 yaitu 0,474 dengan pH rata-rata 7. Pada uji makroskopis isolat bakteri proteolitik didapatkan bentuk koloni bulat berwarna putih dengan pinggir rata dan permukaan koloni halus. Pada pengamatan mikroskopis didapatkan bentuk sel batang agak panjang, gram (+), katalase (+), spora (-), uji KOH (-), dan motilitas (+). Uji makroskopis isolat bakteri pemfermentasi didapatkan bentuk koloni bulat berwarna putih kekuningan dengan bentuk pinggir rata dan permukaan cembung. Pada uji mikroskopis isolat bakteri pemfermentasi didapatkan bentuk sel batang tapi lebih pendek dibandingkan sel bakteri proteolitik, Gram (+), katalase (+), spora (-), uji KOH (-), dan motilitas (+).





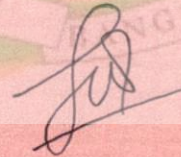
## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang ditulis dengan judul :

**POTENSI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ALAMI PENCERNAAN  
IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis* Valenciennes, 1828)  
SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PAKAN IKAN**

Adalah hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil penelitian kerja/karya orang lain, kecuali kutipan pustaka yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar , maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, juli 2013  
Yang membuat pernyataan



(Dian Maya Sari)  
No. BP. 1121208013



## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia Nya , sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai tugas akhir yang sekaligus merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan tingkat master pada Program Pascasarjana Biologi, Universitas Andalas, Padang. Tesis ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan judul “Potensi Dan Karakterisasi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis* Valenciennes, 1828) Sebagai Kandidat Probiotik Pakan Ikan “.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr.phil.nat Periadnadi dan Ibu Dr. phil.nat Nurmiati, yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tesis ini.

Selanjutnya, Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Syafruddin Karimi , SE, MA selaku direktur Pascasarjana Universitas Andalas
2. Bapak Prof. Dr. Edison Munaf, M. Eng selaku Dekan FMIPA Universitas Andalas Padang
3. Ibu Prof. Dr. Sumaryati Syukur selaku Koordinator Program Pascasarjana FMIPA Universitas Andalas
4. Bapak Prof. Dr. Dahelmi, MS selaku Koordinator Program Pascasarjana Biologi Universitas Andalas

5. Bapak Dr. Anthoni Agustien, MS selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas
6. Bapak Dr. Syifullah, Dr. Ir. Efrizal, Drh. Yuherman, Ph.D sebagai Dosen penguji
7. Kepala Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas beserta Analis
8. Semua pihak yang telah membantu penulis sehingga tesis ini bisa terselesaikan.

Penulis berharap semoga ALLAH SWT meridhai segala usaha dan menilai sebagai amal ibadah yang baik. Semoga tesis ini bermanfaat untuk perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan, serta dapat digunakan sebagai bahan penunjang penelitian di masa yang akan datang.

Padang, Juli 2013

Penulis





## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
RINGKASAN .....	ii
HALAMAN PERSYARATAN .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
RIWAYAT HIDUP .....	vii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	viii
KATA PENGANTAR .....	ix
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Kerapu Bebek .....	5
2.2 Pertumbuhan Bakteri .....	9
2.3 Probiotik .....	11
2.4 Enzim .....	14
2.4.1 Protease .....	14
2.4.2 Amilase .....	15
2.4.3 Selulase .....	17
III. PELAKSANAAN PENELITIAN .....	19
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
3.2 Metode Penelitian .....	19
3.3 Bahan dan Alat .....	19
3.4 Cara Kerja .....	20

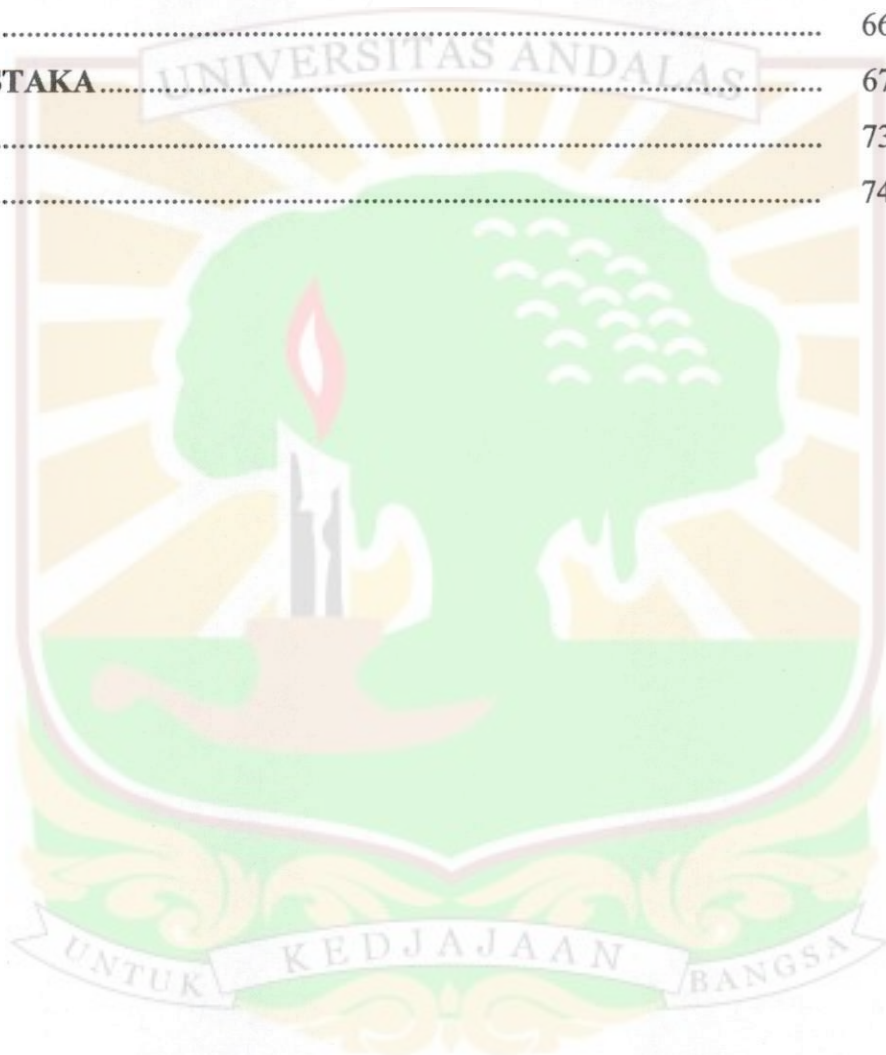
3.4.1 Pengambilan Sampel di Lapangan.....	20
3.4.2 Sterilisasi Alat dan Medium.....	20
3.4.3 Persiapan Media.....	20
3.4.3.1 Pembuatan Medium Glukosa Tripton Agar (GTA) dan GTA + Kalsium Karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) .....	20
3.4.3.2 Pembuatan Medium Skim Milk Agar.....	21
3.4.3.3 Agar Pati beras .....	21
3.4.3.4 Medium Carboxy Metil Selulosa (CMC) .....	21
3.4.4 Persiapan Reagen .....	22
3.4.4.1 Reagen <i>Lugol's Iodine</i> .....	22
3.4.4.2 Reagen <i>Congo Red</i> .....	22
3.4.4.3 Buffer posfat borat, pH 8 .....	22
3.4.4.4 Substrat.....	22
3.4.4.5 Buffer Asetat pH 4 .....	23
3.4.4.6 Reagen Folin Ciocalteus Phenol .....	23
3.4.4.7 Enzim .....	23
3.4.5. Pembuatan Larutan Pereaksi .....	23
3.4.5.1 Larutan Nalson .....	23
3.4.5.2 Larutan Arsenomolibdat.....	24
3.4.5.3 Pembuatan kurva baku glukosa .....	24
3.4.5.4 Pembuatan Larutan Estándar Glukosa.....	25
3.4.6 Tahap Pelaksanaan.....	25
3.4.6.1 Isolasi mikroflora normal dari usus ikan kerapu bebek ( <i>C. altivelis</i> ) .....	25
3.4.6.2 Penghitungan Populasi Bakteri.....	26
3.4.6.3 Penghitungan Indeks Bakteri Alami Usus Ikan Kerapu Bebek ( <i>C. altivelis</i> ) .....	26
3.4.6.4 Uji Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Mikroflora Indigenous Pencernaan Ikan Kerepu Bebek .....	27
3.4.6.4.1 Pewarnaan Gram .....	27
3.4.6.4.2 Uji Katalase.....	28



3.4.6.4.3 Reaksi Terhadap Pewarnaan Endospora .....	28
3.4.6.4.4 Motilitas .....	29
3.4.6.4.5 Uji KOH .....	29
3.4.6.5 Aktivitas Enzim .....	29
3.4.6.5.1 Protease .....	29
3.4.6.5.2 Selulase .....	30
3.4.6.5.3 Amilase .....	32
3.4.6.6 Persiapan Larutan Induk .....	32
3.4.6.7 Persiapan starter cair .....	32
3.4.6.8 Penghitungan Kadar Gula .....	32
3.4.6.9 Nilai pH .....	33
3.5 Pengamatan .....	33
3.5.1 Isolasi dan Perbanyakkan Isolat Mikroflora Indigenous .....	33
3.5.2 Keberadaan dan Karakteristik Mikroflora Indigenous pencernaan ikan Kerapu Bebek .....	33
3.5.3 Indeks Amilolitik dan Indeks Selulolitik Mikroflora Indigenous .....	34
3.5.4 Aktivitas Bakteri .....	34
3.5.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	34
3.5.6 Kadar Gula .....	35
3.5.7 Nilai pH .....	35
3.5.8 Aktivitas Enzim Bakteri Proteolitik dan Bakteri Pemfermentasi .....	35
3.5.9 Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek .....	35
3.6 Analisa Data .....	36
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>37</b>
4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek Kandidat Probiotik .....	37
4.2 Karakteristik bakteri alami pada pencernaan ikan Kerapu Bebek ( <i>Cromileptes altivelis</i> ) .....	43
4.3 Potensi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek .....	50
4.3.1 Diameter Halozone Isolat Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek .....	50
4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	55



4.5 Potensi Isolat Bakteri Proteolitik dan Bakteri Pemfermentasi .....	57
4.5.1 Potensi Amilolitik dan Selulolitik Isolat Bakteri Pemfermentasi .....	57
4.5.2 Potensi Protease Isolat Bakteri Proteolitik .....	60
4.5.2 Kadar Gula.....	62
4.5.2 Nilai pH .....	63
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>65</b>
5.1 Kesimpulan.....	65
5.2 Saran .....	66
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>67</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>73</b>
<b>BIODATA.....</b>	<b>74</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan prosedur aktivitas enzim protease blanko dan sampel.....	30
2. Total bakteri alami dalam pencernaan ikan Kerapu Bebek.....	41
3. Hasil uji makroskopis dan mikroskopis bakteri proteolitik dan pemfermentasi.....	45

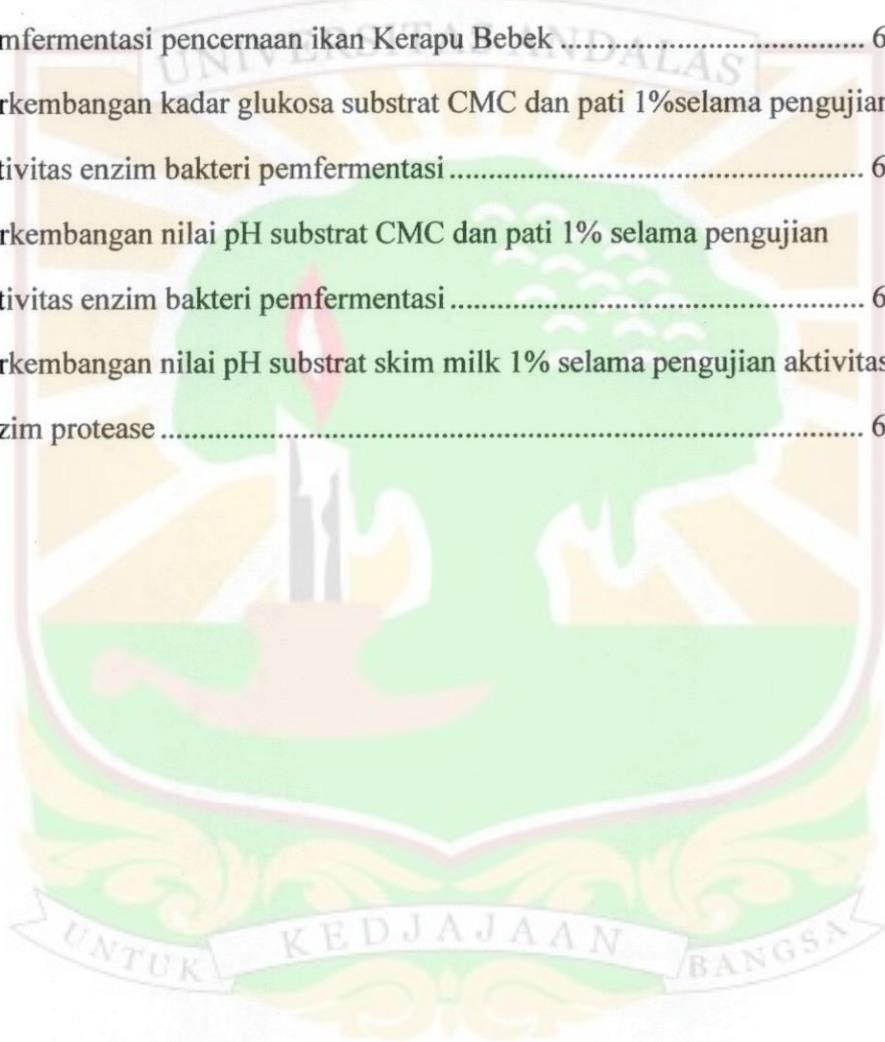


## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerapu Bebek ( <i>Cromileptes altivelis</i> ) .....	6
2. Kurva pertumbuhan bakteri secara umum pada batch kultur .....	10
3. Ikan Kerapu Bebek yang dikembangkan di Balai Benih Ikan Teluk Buo Bungus Padang Sumatera barat .....	37
4. Daerah halo yang terbentuk dari keberadaan bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek.(1) bakteri pemfermentasi dalam medium GTA+CaCO <sub>3</sub> , (2) bakteri proteolitik dalam medium Skim milk agar.....	38
5. A. Isolat bakteri proteolitik, B. Isolat bakteri Pemfermentasi .....	43
6. A. Koloni bakteri isolat proteolitik pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium Skim Milk Agar , B. Mikroskopis bakteri proteolitik pencernaan ikan Kerapu Bebek (10X100).....	44
7. A. Koloni bakteri isolat pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium GTA+CaCO <sub>3</sub> . B. Mikroskopis bakteri pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek (10X100).....	44
8. Koloni isolat bakteri pencernaan ikan Kerapu Bebek untuk pengukuran indeks proteolitik (A) pada medium SMA, indeks pemfermentasi (B) pada medium GTA, indeks Selulolitik (C) pada medium CMC, indeks Amilolitik (D) pada medium ATB. ....	52
9. Indeks proteolitik dan indeks pemfermentasi bakteri-bakteri alami pencernaan ikan kerapu .....	52
10. Indeks amilolitik dan selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri pemfermentasi .....	54



11. Pertumbuhan bakteri-bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium cair Skim Milk dan Glukosa Tripton (CFU/ml) .....	56
12. Perkembangan aktivitas Selulase dan Amilase isolat bakteri pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek .....	59
13. Perkembangan aktivitas Selulase dan Amilase isolat bakteri pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek .....	61
14. Perkembangan kadar glukosa substrat CMC dan pati 1% selama pengujian aktivitas enzim bakteri pemfermentasi .....	64
15. Perkembangan nilai pH substrat CMC dan pati 1% selama pengujian aktivitas enzim bakteri pemfermentasi .....	65
16. Perkembangan nilai pH substrat skim milk 1% selama pengujian aktivitas enzim protease .....	66



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja Isolasi bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek.....	75
2. Skema karakteristik kurva pertumbuhan bakteri.....	76
3. Kurva standar glukosa.....	77
4. Nilai pH substrat CMC, pati dan Skim .....	77
5. Aktivitas enzim selulase, amilase dan protease .....	78
6. Kadar gula .....	78
7. Nilai total bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek.....	79
8. Log kurva pertumbuhan .....	80
9. Nilai indeks amilae, fermentatif, selulolitik, dan proteolitik.....	80
10. Foto-foto uji karakteristik bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek..	81

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan Kerapu Tikus atau juga biasa dikenal dengan Kerapu Bebek (*Chromileptes altivelis*) merupakan ikan buas yang hidup di dasar laut. Ikan ini memiliki bentuk tubuh agak pipih dan berwarna dasar abu-abu dengan bintik-bintik hitam di seluruh permukaan tubuh. Ikan Kerapu Bebek adalah salah satu dari beberapa ikan kerapu yang mulai dikembangkan dalam usaha budidaya. Menurut Amiruddin (2008) ikan kerapu bebek banyak diincar eksportir karena paling laris dan paling tinggi harganya. Selain potensi budidaya yang menjanjikan kerapu hasil budidaya juga akan lebih sehat dan lebih tahan hidup.

Dalam kegiatan budidaya, pakan memegang peranan penting. Huet (1971) menyatakan bahwa pakan merupakan faktor yang berpengaruh secara dominan terhadap pertumbuhan ikan karena berfungsi sebagai pemasok energi untuk memacu pertumbuhan. Felliatra *et al.*, (2004) juga menambahkan makanan yang terbuang dan tidak sempat dikonsumsi ikan memang tidak akan pernah terelakkan, karena memang kondisi alam berupa air dan juga tingkah laku ikan itu sendiri. Akan tetapi makanan atau nilai nutrisi yang terbuang padahal sudah dimakan oleh ikan, tentu teramat disayangkan.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut maka dikembangkan pakan buatan dengan menambahkan bakteri probiotik. Menurut Soeharsono (2010) perkembangan probiotik dibidang perikanan dimulai dengan kemungkinan



mengganti antibiotik buatan yang digunakan secara berlebihan untuk menghadapi kendala penyakit yang disebabkan bakteri patogen. Penggunaan antibiotik pada akuakultur malah diikuti dengan bertambahnya penyakit patogenik, karena meningkatnya resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik. Untuk itu penggunaan probiotik alami merupakan salah satu cara yang tepat karena penggunaan probiotik alami sementara ini belum dapat dibuktikan efek negatifnya. Menurut Fuller, 1987 *cit* Feliatra (2004) probiotik merupakan makanan tambahan berupa sel-sel mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba intestinalnya .

Telah banyak penelitian yang mengkaji tentang efek dari penggunaan probiotik alami. Diantaranya Soeharsono (2010) menyatakan pada dasarnya manfaat probiotik sebagai bahan aditif ditunjukkan dengan meningkatnya ketersediaan lemak dan protein bagi ternak, disamping itu probiotik juga meningkatkan kandungan vitamin B kompleks melalui fermentasi makanan. Probiotik juga dapat meningkatkan kekebalan (immunity), mencegah alergi makanan dan kanker (colon cancer). Selain itu, keuntungan penggunaan probiotik dari asam laktat adalah memberikan daya tahan dan pemulihan kesehatan saluran pencernaan, mengurangi bau feses yang tidak enak, memberi suasana asam pada saluran pencernaan , metabolit yang dihasilkan dapat menghambat pthogen, meningkatkan fungsi imunitas, dan bahan anti karsinogenik. Hasil penelitian Felliatra *et al.*, (2011) juga menunjukkan bahwa ikan kerapu macan memiliki 9

spesies bakteri yang berpotensi sebagai probiotik, yaitu *Lactococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, dan *Bifidobacterium sp.* Kesembilan bakteri ini berpotensi sebagai probiotik karena memiliki ketahanan pada pH 2 yang merupakan indikator utama sebagai bakteri probiotik.

Probiotik pada akuakultur besar manfaatnya. Menurut Irianto, A (2010) kehadirannya bisa berperan antara lain sebagai imun untuk daya tahan, menghambat patogen, dan peningkatan nilai nutrisi melalui penyerapan maksimal. Namun pengetahuan tentang potensi dan karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek sebagai kandidat probiotik pakan ikan masih sedikit. Sehingga dilakukan penelitian dengan judul “Potensi dan karakterisasi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek (*Chromileptes altivelis*) Sebagai kandidat Probiotik Pakan ikan”.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang yang dikemukakan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimanakah keberadaan bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) ?
2. Bagaimanakah potensi bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek?
3. Bagaimanakah karakteristik isolat bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek yang digunakan sebagai kandidat probiotik pakan ikan ?



### 1.3 Tujuan Penelitian

Dalam menjawab permasalahan yang telah dikemukakan diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui keberadaan bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*).
2. Mengetahui potensi bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek.
3. Mengetahui karakteristik isolat bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek yang digunakan sebagai kandidat probiotik pakan ikan .

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang potensi dan karakteristik isolat bakteri alami dari pencernaan ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) sebagai kandidat probiotik pakan ikan.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kerapu Bebek

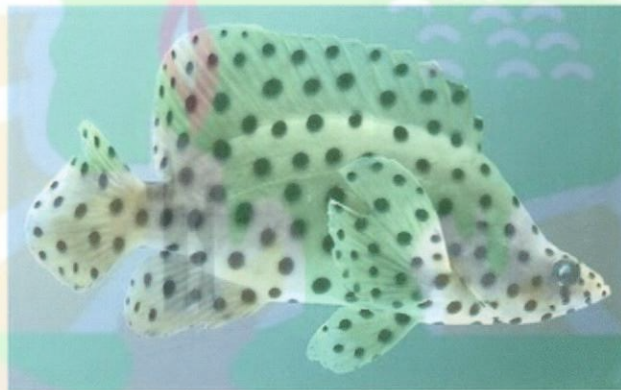
Kerapu Bebek (*Chromileptes altivelis*) hanyalah satu dari 46 spesies kerapu yang hidup di berbagai tipe habitat perairan laut. Ikan ini bertubuh agak pipih dan berwarna dasar abu-abu dengan bintik-bintik hitam di seluruh permukaan tubuh. Kepalanya kecil dengan moncong agak meruncing. Ukuran konsumsinya berkisar 0,5kg—2kg. Di pasar internasional dia dikenal dengan nama polka-dot grouper. Ada juga yang menyebutnya hump-backed rockcod. Selain dijual untuk konsumsi, sewaktu muda ia juga laku sebagai ikan hias dan populer dengan nama grace kelly (Murdjani, 2007).

Menurut Weber dan Beaufort, (1940) *cit* Amiruddin (2008), klasifikasi ikan Kerapu Tikus adalah sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Sub class	: Actinopteri
Ordo	: Perciformes
Sub ordo	: Percoidea
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Chromileptes</i>
Spesies	: <i>Chromileptes altivelis</i> Valenciennes, 1828

Ikan Kerapu Tikus mempunyai ciri-ciri morfologi sirip punggung dengan 10 duri keras dan 18 -19 duri lunak, sirip perut dengan 3 duri keras dan 10 duri lunak, sirip ekor dengan 1 duri keras dan 70 duri lunak. Panjang total 3,3 – 3,8

kali tingginya, panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin tua semakin cekung, mata seperenam kepala, sirip punggung semakin kebelakang semakin melebar, warna putih kadang kecoklatan dengan totol hitam pada badan, kepala dan sirip Weber and Beoford (1940) *cit* Ahmad (1991). Sedangkan menurut Heemstra and Randall (1993) dalam Evalawati dkk. (2001) seluruh permukaan tubuh Kerapu Tikus berwarna putih keabuan, berbintik bulat hitam dilengkapi sirip renang berbentuk melebar serta moncong kepala lancip menyerupai Bebek atau Tikus.



Gambar 1. Kerapu bebek (*Chromileptes altivelis* Valenciennes, 1828)

Menurut Amiruddin, (2008) daerah penyebaran Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dimulai dari Afrika Timur sampai Pasifik Barat Daya. Di Indonesia Kerapu Tikus banyak ditemukan di perairan Pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Buru dan Ambon. Salah satu indikator adanya Kerapu Tikus adalah perairan karang yang terhampar hampir diseluruh perairan pantai di Indonesia.

Siklus hidup Kerapu Tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 m. Kerapu Tikus muda dan larva banyak terdapat di perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar perairan berupa pasir berkarang yang



banyak ditumbuhi padang lamun. Pada kerapu dewasa bermigrasi ke perairan lebih dalam antara 7-40 m, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari. Telur dan larva bersifat pelagis, sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal.

Ikan Kerapu Tikus digolongkan sebagai ikan buas demersal atau ikan buas yang hidup di dasar laut. Dasar laut yang disukai adalah terdiri atas pasir karang yang terdapat di perairan dangkal dengan kedalaman berkisar antara 10- 40 meter dalam siklus hidupnya Kerapu Tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5 - 3,0 meter.

Ikan Kerapu Tikus merupakan hewan karnivor, sebagaimana jenis-jenis ikan kerapu lainnya. Ikan Kerapu Tikus dewasa adalah pemakan ikan-ikan kecil, kepiting, dan udang-udangan, sedangkan larvanya pemangsa larva moluska (trokofor), rotifer, mikro krustasea, kopepoda, dan zooplankton. Sebagai ikan karnivora, kerapu cenderung menangkap mangsa yang aktif bergerak di dalam kolom air (Nybakken, 1988). Tampubulon dan Mulyadi (1989), mengungkapkan bahwa ikan kerapu mempunyai kebiasaan makan pada siang hari dan malam hari, namun lebih aktif pada waktu fajar dan senja hari.

Kebutuhan metabolisme ikan yang masih kecil rumit, dimana mereka memiliki metabolisme yang lebih tinggi dan membutuhkan periode fotofase panjang dengan pemberian pakan terus - menerus (Papandroulakis *et al*, 2001).

Menurut Bedjo Slamet *et al.*, (2010) adapun pertumbuhan dan perkembangan ikan kerapu lumpur sebagaimana halnya dengan ikan kerapu lain,

kerapu lumpur bersifat protogony hermaphrodite. Artinya jenis kelamin ikan berubah sejalan dengan pertumbuhannya. Pada waktu masih berumur 3 tahun atau kurang, ikan ini berkelamin betina. Namun sesudah berumur lebih dari 4 tahun ikan ini berubah kelamin menjadi jantan tanpa perubahan morfologi yang jelas. Ikan ini tumbuh cepat, pertumbuhan ikan kerapu Lumpur beragam, tergantung pada bobot awal, mutu dan jumlah pakan yang digunakan dan kondisi lingkungan. Panjang maksimum yang dapat dicapai sampai 95 cm. Ikan kerapu lumpur hidup diperairan muara sungai dengan kisaran kadar garam 15-30 ppt, suhu air 24-31 derajat Celsius, dan kadar oksigen terlarut antara 7,1-31 ppt.

Laining (2004) mencatat bahwa laju pertumbuhan kerapu bebek yang diberi pakan ikan rucah tidak berbeda nyata dibanding dengan yang diberi pellet. Ikan yang diberi pakan rucah tumbuh dari berat awal 13,20 g menjadi 50,80 g dalam waktu 90 hari. Sedangkan ikan kerapu bebek yang diberi pellet tumbuh dari berat awal 13,7 g menjadi 51,6 g dalam waktu yang sama.

Untuk pembesaran jenis ikan kerapu bebek diperlukan pellet terapung dengan kadar protein 47,5%, lemak 8,2%, serat kasar 8,54% dan kalori total 2,963kcal kering (Sutarmat, *et al.*, 2003). Pemberian pakan berkisar antara 2 – 10% berat badan pada saat ikan yang ditebar masih berukuran kurang 10 gr, dan berkurang menjadi antara 1 – 2% berat badan setelah beratnya lebih dari 10 gr (Cholik, F *et al.*, 2005).



## 2.2 Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan pada bakteri didefinisikan sebagai pertambahan berat sel. Karena berat relatif sama pada setiap siklus sel, maka pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah sel (Purwoko, 2007). Jika bakteri ditumbuhkan pada suatu media dengan nutrisi yang cukup dan kondisi lingkungan yang cocok, maka bakteri akan terus tumbuh sampai salah satu faktor mencapai minimum dan pertumbuhan menjadi terbatas (Schlegel dan Schmidt, 1994).

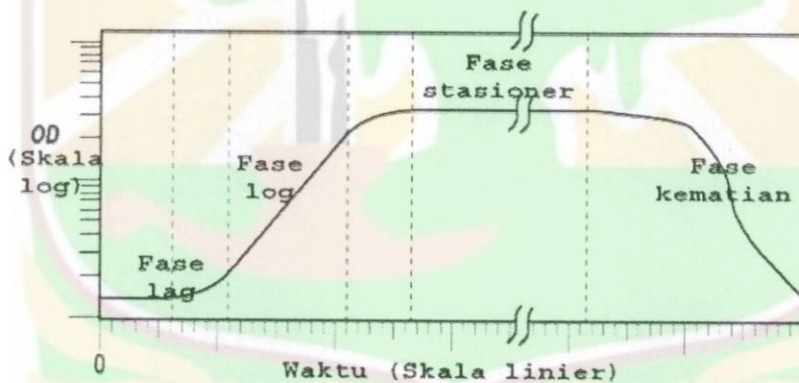
Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama : fase lag(fase lamban atau lag phase), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau log phase), fase stationer (fase statis atau stationary phase) dan fase penurunan populasi (decline). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteridalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periodeperalihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Brock & Madigan,1991)

Pada lag phase, tidak ada peningkatan jumlah sel atau turbiditas karena bakteri sedang beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah adanya kemungkinan medium tidak optimal untuk organisme sehingga organisme perlu mensintesa enzim agar mampu menggunakan substrat sebagai sumber energi atau untuk sintesis material sel (Sa'id, 1987).

Dikatakannya pula bahwa tahap pertumbuhan eksponensial atau logaritmik ditandai oleh kecepatan pembelahan maksimum yang konstan.

Kecepatan pembelahan pada fase logaritmik bersifat spesifik untuk tiap jenis bakteri dan tergantung pada kondisi lingkungan, misalnya suhu dan komposisi medium kultur (Middelbeek *et al.*, 1992)

Tahap stasioner dimulai ketika sel-sel sudah tidak tumbuh lagi. Kecepatan pertumbuhan tergantung dari kadar substrat. Menurunnya kecepatan pertumbuhan sudah terjadi ketika kadar substrat berkurang sebelum substrat habis terpakai. Penurunan kecepatan pertumbuhan juga disebabkan oleh kepadatan populasi yang tinggi, tekanan parsial oksigen yang rendah dan timbunan produk metabolisme yang bersifat toksik (mengintroduksi tahap stasioner) Purwandhani, S *et al.*, (2000).



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Secara Umum pada Batch Culture (Widdle, 2007).

Ada beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu faktor-faktor fisika dan faktor-faktor kimia. Faktor-faktor fisika yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri antara lain yaitu suhu, ketersediaan air, pH, tekanan hidrostatik dan cahaya (Middelbeek dan Drijver – de Haas, 1992). Faktor-faktor kimia sebagai sumber nutrisi yang juga mempengaruhi



pertumbuhan yaitu makro nutrien (C, O, N, H, P dan S), mikro nutrien atau trace element (Mn, ZnCo, Mo, Ni, Cu, dan Cl) dan faktor-faktor pertumbuhan (Middelbeek *et al.*, 1992)

### 2.3 Probiotik dan Probiotik Pakan

Probiotik merupakan produk yang mengandung mikroorganisme hidup non patogen yang berfungsi sebagai penghambat bakteri patogen (Mukholifah, 2010). Fuller (1989) mendefinisikan probiotik sebagai suatu produk yang mengandung mikroba hidup non patogen, yang diberikan pada hewan atau manusia dan memberikan keuntungan kepada inangnya melalui perbaikan keseimbangan mikrobiota di pencernaan. Sedangkan Vicko Nugroho (2012) mengungkapkan bahwa probiotik adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendukung pertumbuhan dan produktifitas ikan dan udang. Penerapan probiotik pada ikan atau udang selain berfungsi untuk meyeimbangkan mikroorganisme dalam pencernaan agar tingkat serapannya tinggi, probiotik juga bermanfaat menguraikan senyawa-senyawa sisa metabolisme dalam air, sehingga probiotik dapat berfungsi sebagai bioremediasi, biokontrol, imunostimulan serta memacu pertumbuhan.

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim kh pencernaaan yang dimiliki oleh mikroba

untuk memecah ikatan tersebut. Enzim tersebut biasanya tidak dimiliki oleh ikan dan makhluk air lainnya (Felliatra, 2002 ).

Menurut Feliatra (2002) pada saat memilih mikroorganisme yang akan dijadikan probiotik, persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah 1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen (manusia dan hewan lainnya), 2) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat, 3) mikroba tersebut hendaklah dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak, 4) dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam pencernaan ikan, 5) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam pencernaan ikan, dan 6) dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan.

Dampak positif dari pemberian probiotik adalah pada perbaikan bobot badan dan konversi pakan. Efek positif diperoleh baik dari direct nutritional effect atau pada sanitary effect (Gulliot, 1998 dalam Soeharsono, 2002). Pada nutritional effect dapat mengurangi reaksi metabolis yang menghasilkan substansi toxin/beracun, menstimulasi enzim indigenous, menghasilkan vitamin atau substansi antimikroba (Rostika, 2010 dalam Soharsono, 2010). Sementara itu pada sanitary effect dapat meningkatkan ketahanan kolonisasi, dan menstimulasi respon imun (Soeharsono, 2010).

Hasil penelitian felliatra,et al., 2004 menyatakan bakteri pada genus *Bacillus*, *Bifidobacteri*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, dan *Micrococcus* telah terbukti sebagai bakteri yang menguntungkan dan dapat hidup berasosiasi sebagai



flora normal pada organisme baik di dalam maupun di luar tubuh, sedangkan bakteri dari lainnya masih diduga sebagai bakteri probiotik yang menguntungkan. Menurut Nursyirwani *et al.*, (2007), beberapa jenis probiotik yang sering digunakan yaitu *Bifidobacterium bifidus*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Streptococcus thermophilus*.

Pendapat lain dinyatakan oleh Macey dan Coyne (2005), probiotik yang mempunyai pengaruh positif bagi inangnya memiliki beberapa kriteria, antara lain tidak bersifat patogen; sebaiknya merupakan mikroflora normal pencernaan agar lebih mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan pencernaan; toleran terhadap asam lambung dan garam empedu; memiliki kemampuan untuk menempel dan mengkolonisasi sel pencernaan; dan memiliki pengaruh yang menguntungkan terhadap kesehatan.

Hasil penelitian Widagdo (2011) menyatakan ketahanan isolat terhadap asam lambung dan garam empedu menggambarkan kemampuan bakteri kandidat probiotik dalam bertahan di kondisi asam dan basa, yang dinyatakan dalam selisih jumlah isolat bakteri dalam media kontrol dan perlakuan selama periode pengamatan. Hasil pengujian ketahanan isolat bakteri probiotik SKT-b terhadap asam lambung dan garam empedu menunjukkan bahwa probiotik SKT-b tahan terhadap asam lambung dan garam empedu. Hal ini ditunjukkan dari kecilnya

selisih jumlah sel bakteri probiotik SKT-b pada media kontrol (pH 7) dengan pH asam (pH 2,5) dan pH basa (pH 7,5) .

Menurut Macey dan Coyne (2005) kriteria isolat bakteri berikutnya yang perlu dipertimbangkan sebagai probiotik adalah kemampuannya dalam bertahan pada kondisi asam dan basa. Toleran pada asam lambung dan garam empedu merupakan syarat terpenting kandidat probiotik. Hal ini terjadi karena pada saat bakteri tersebut masuk ke dalam tubuh inang, bakteri tersebut akan melewati lambung yang ada dalam suasana asam dan selanjutnya akan melewati garam empedu dengan pH basa di pencernaan. Ketahanan isolat bakteri terhadap asam lambung dan garam empedu direfleksikan oleh ketahanannya pada media asam dan basa, yang dinyatakan dalam selisih jumlah isolat dalam media kontrol dan perlakuan selama periode pengamatan. Semakin kecil selisih maka semakin besar ketahanan isolat bakteri pada pH rendah dan pH tinggi. Bakteri yang berhasil bertahan pada kondisi pH rendah dinyatakan bersifat tahan atau resisten terhadap asam lambung, sedangkan bakteri yang berhasil hidup pada pH basa dinyatakan bersifat tahan atau resisten terhadap garam empedu.

## 2.4 Enzim

### 2.4.1 Protease

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh



mikroorganisme, serta mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983).

Enzim proteolitik pada ikan diklasifikasikan sebagai berikut : (a) protease asam (pepsin) ; (b) protease serin (tripsin dan kimotripsin); (c) katepsin dan thiol proteinase ; dan (d) karboksipeptidase dan aminopeptidase (Orejana, 1983). Katepsin merupakan salah satu enzim proteolitik yang ditemukan pada jaringan hewan termasuk ikan yang dapat menghidrolisis protein menjadi polipeptida. Katepsin banyak ditemukan dalam jaringan otot ikan. Pada jaringan otot ikan, katepsin dan enzim penghidrolisis lainnya ditempatkan dalam organel sub seluler atau disebut lisosom dan dibagi dalam dua tempat, yakni pada serabut otot dan matriks ekstraseluler (Shahidi dan Botta, 1994).

Enzim proteolitik mempunyai peran dalam mengontrol berbagai proses biologis dalam tubuh (Almeida *et al.*, 2001) . peningkatan panas yang semakin tinggi sampai batas tertentu akan meningkatkan aktivitas enzim dalam hidrolisis protein (Siswanto dan Soedarto, 2008). Manuang (1995) menyatakan bahwa enzim yang terlibat dalam proses fermentasi dapat berasal dari mikroba, daging ikan itu sendiri (katepsin), dan enzim yang berasal dari organ isi perut ikan (tripsin, khemotripsin dan pepsin),

#### 2.4.2 Amilase

Amilase adalah kelompok enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisis pati, suatu polimer glukosa yang banyak terdapat pada polisakarida tumbuh-tumbuhan seperti beras, jagung, kentang, tapioka dan terigu. Amilase yang terlibat

dalam hidrolisis pati ialah  $\alpha$  amylase (1,4- $\alpha$ -D-glukan  $\alpha$ -glukanohidrolase),  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolase), glukoamilase (1,4-D-glukan glukohidrolase), glukosidase (1,4-glukan glukohidrolase) dan enzim pemutus cabang pullulanase (pullulan 6-glikanohidrolase) dan isoamilase (glikogen 6-glukanohidrolase) (Ballschmiter *et al.*, 2006 cit Raharjo *et al.*, 2008)

Ada beberapa cara kerja amilase dalam memecah substrat: a) menghidrolisis dari bagian dalam molekul substrat (endo-splitting) atau dari luar (exo-splitting), b) retensi atau konfigurasi inversi, c) menghidrolisis ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 versus  $\alpha$ ,1-6 dan d) tipe reaksi hidrolisis atau transfer.  $\alpha$ -amilase merupakan enzim yang memecah dari dalam molekul yang menghidrolisis ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 secara random dari substrat, menghasilkan sebagian besar maltosa dan sedikit glukosa. Ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik tidak dipotong oleh  $\alpha$ -amilase tetapi ikatan tersebut tidak menghambat kerja amilase. Hampir semua  $\alpha$ -amilase termasuk metaloenzim kalsium memiliki ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam strukturnya yang berguna untuk stabilitas enzim.  $\alpha$ -amilase memainkan peranan penting selama degradasi pati karena menyumbangkan 40- 60% sintesis protein de novo dan satu-satunya enzim yang dapat secara langsung menyerang dan menghidrolisis granul pati (Godbole *et al.*, 2003 cit. Jamilah 2011).

$\beta$ -amilase merupakan enzim yang memecah dari luar dan melepas unit maltosa secara berurutan dari ujung non reduksi dari ikatan polisakarida. Jika substrat memiliki ikatan  $\alpha$ -1,6 seperti amilopektin, pemecahan pada rantai tersebut akan berhenti. Glukoamilase merupakan enzim yang memotong molekul substrat dari dalam dan memecah unit glukosa secara berurutan dari ujung non reduksi dari rantai substrat. Kerja enzim pada substrat akan menurun bila bertemu dengan ikatan  $\alpha$ -1,6 seperti pada amilopektin dan glikogen, tetapi ikatan tersebut



dihidrolisis. Pululanase adalah enzim yang memecah dari dalam, menghidrolisis pululan pada ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,6 (Whitaker 1994*cit.* Jamilah 2011).

Pati merupakan substrat bagi amilase. Molekul pati merupakan polimer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6 glikosidik. Perbedaan ikatan penghubung ini membedakan struktur molekul pati yang terdiri atas amilosa bagian yang tidak bercabang; merupakan polimer rantai tunggal terdiri atas 500 sampai 2000 unit glukosa yang memiliki ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik dengan penghubung  $\alpha$ -1,6 glikosidik yang menghasilkan cabang polimer glukosa disebut amilopektin. Hidrolisis pati oleh amilase pertama-tama menghasilkan polimer rantai pendek yang disebut dekstrin, kemudian disakarida maltosa dan terakhir adalah glukosa.  $\alpha$  dan  $\beta$ -amilase menghidrolisis pati secara menyeluruh menjadi maltosa karena amilosa hanya memiliki ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik tetapi biasanya menyisakan beberapa maltotriosa. Glukoamilase menghidrolisis amilosa secara menyeluruh menjadi glukosa, beberapa maltose tetapi karena hidrolisis yang lambat dari enzim ini maltotriosa dapat tersisa pada ujung (Whitaker 1994*cit.* Jamilah 2011). Degradasi pati menjadi maltodextrin kemudian oleh berbagai bakteri dikatalisis oleh  $\alpha$ -amilase dan diikuti oleh hidrolisis menjadi glukosa oleh  $\alpha$ -glikosidase ekstraseluler (Vihinem & Mansala 1989*cit.* Jamilah 2011).

#### 2.4.3 Selulase

Selulosa merupakan komponen dasar pembentuk dinding tanaman, yang menyusun sekitar setengah dari tanaman keras dan sepertiga dari tanaman setahun. Struktur molekul selulosa tersusun dari 8.000-12.000 unit-unit glukosa yang terikat satu sama lain oleh ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosida, membentuk rantai polimer yang linear. Ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosida yang kuat akan membentuk

mekrofibril selanjutnya membentuk fibril dan kemudian secara sama-sama membentuk serat selulosa yang tidak larut. Mikrofibril terdiri dari daerah kristalin yang diselingi oleh daerah amorf. Daerah kristalin pada mikrofibril merupakan daerah yang memiliki keteraturan yang tinggi dan sulit ditembus oleh molekul air. Sebaliknya daerah amorf merupakan daerah yang memiliki keteraturan yang rendah sehingga mudah ditembus oleh molekul- molekul air (Pairunan, 2009).

Hidrolisis selulosa secara enzimatis melibatkan sejumlah enzim yang bekerja secara sinergis. Selulase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis selulosa dengan cara memutuskan ikatan  $\beta$ - (1,4)- glikosida. Selulase merupakan kompleks enzim yang terdiri dari tiga jenis enzim. Ketiga jenis enzim tersebut adalah eksoglukanase (C1), Endoglukanase (Cx) serta  $\beta$ -glukosidase (Irawadi 1990 *cit.* Pairunan 2009).

Menurut Irawadi 1990 *cit* Pairunan (2009) mekanisme hidrolisis enzimatis selulosa terbagi menjadi empat tahap (Gambar 4). Pada tahap pertama endoglukanase menyerang bagian amorf dari serat selulosa sehingga membuka jalan bagi enzim selobiohidrolase. Tahap selanjutnya selobiohidrolase akan membebaskan unit selobiosa dari ujung-ujung non reduksi rantai selulosa. Aktivitas yang sinergis antara kedua enzim disebabkan substrat baru dari selobiohidrolase yang terbentuk pada tahap tiga. Tahap akhir dari proses ini adalah enzim  $\beta$ -glukosidase akan menghidrolisis selooligosakarida dan selobiosa menjadi glukosa. Kim (1995) menambahkan mikroorganisme mensintesis beberapa jenis enzim untuk dapat menggunakan selulosa, selama senyawa tersebut berada dalam substrat yang kompleks. Pada beberapa mikroorganisme, beberapa jenis enzim ini ditemukan dalam suatu asosiasi multiprotein kompleks yang termasuk pada kelompok selulosa yang sering disebut selulosome.



### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Desember 2012 sampai Februari 2013 di Laboratorium Riset dan Mikrobiologi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang.

#### 3.2 Metode Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan metoda eksperimen terhadap karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*), serta dianalisa secara deskriptif.

#### 3.3 Alat Dan Bahan

##### 3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain: inkubator, autoklaf, erlenmeyer, pemanas, alumunium foil, lampu Bunsen, cawan petri, neraca Ohaus dengan ketelitian 0,1 g, gelas ukur, tabung reaksi, kapas, motor steril, pipet (0,1, 1,0 dan 10 ml) dan pro pipet, janke dan kunkel, mikroskop binokuler, gelas objek, glass spreader, jarum oase dan colony counter.

##### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah ikan Kerapu Tikus, Medium Skim Milk Agar (SMA), Glukosa Tripton agar (GTA), GTA+CaCo<sub>3</sub>, Rhodamin B, Pati Agar, CMC, Aquadest, Alkohol, dan Spiritus.

### 3.4 Cara Kerja

Secara singkat dapat dilihat pada skema kerja (Lampiran 1 dan lampiran 2).

#### 3.4.1 Pengambilan Sampel di lapangan

Ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) yang isi pencernaannya dijadikan sebagai sampel didapat dari Balai Benih Ikan Pantai Teluk Buo Bungus Padang Sumatera Barat.

#### 3.4.2 Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat dan medium yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 15lbs selama 20 menit. Hal ini dilakukan untuk pencegahan kontaminasi dari alat-alat dan medium yang digunakan (Lay, 1994).

#### 3.4.3 Persiapan Media

##### 3.4.3.1 Pembuatan Medium Glukosa Tripton Agar (GTA) dan GTA + Kalsium Karbonat ( $\text{CaCO}_3$ )

Medium yang digunakan adalah media Glukosa Tripton Agar (GTA) dengan komposisi 20 gram Glukosa, 2,5 gram Tripton dan 20 gram Agar. Pada medium GTA modifikasi dilakukan penambahan Tripton ganda menjadi 5 gram. Medium GTA juga dimodifikasi dengan penambahan  $\text{CaCO}_3$  sebanyak 15 gram/L berguna untuk melihat aktifitas mikroba dalam menghasilkan asam. Kemudian dicukupkan volumenya dengan aquades menjadi 1000 ml dan pH nya 7,2. Setelah itu medium dimasukkan ke dalam erlemeyer untuk disterilkan dengan autoclave



pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada tekanan 15 lbs selama 15 menit (Periadinadi dan Nurmiati, 2010 *cit.* Rahmadani 2011).

#### 3.4.3.2 Pembuatan Medium Skim Milk Agar

Medium Skim Milk Agar adalah medium selektif yang digunakan untuk melihat kemampuan proteolitik dari suatu mikroba. Medium ini berkomposisi 40 gram Susu Skim dan 15 gram Agar. Susu Skim dan Agar dilarutkan dengan 1000 ml Aquades dihomogenkan dan dimasak kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit (Wulandari, Irda dan Asnaini, 2005).

#### 3.4.3.3 Agar Pati Beras (APB)

Agar Pati Beras adalah medium selektif untuk melihat dan menguji kemampuan amilolitik suatu mikroba. Medium ini berkomposisi 40 g pati beras, 1 g yeast extract, 20 g agar yang dicukupkan volumenya menjadi 1000 ml dengan akuadest, dihomogenkan dan selanjutnya disterilisasi (Periadinadi, 2005).

#### 3.4.3.4 Medium Carboxy Metil Selulosa (CMC)

Medium CMC adalah medium selektif untuk melihat dan menguji kemampuan selulolitik suatu mikroba. Medium ini berkomposisi 1 % CMC, 20 g agar, 1 g Peptone yang dicukupkan volumenya menjadi 1000 ml dengan akuadest, dihomogenkan dan selanjutnya disterilisasi (Periadinadi dan Nurmiati, 2010).

### 3.4.4 Perisapan Reagen

#### 3.4.4.1 Reagen *Lugol's Iodine*

*Lugol's Iodine* digunakan sebagai indikator untuk mewarnai pati pada medium Pati Agar, sehingga daerah bening yang dihasilkan disekitar pertumbuhan mikroflora amilolitik akan terlihat lebih jelas. *Lugol's Iodine* berkomposisi 1 g iodine ( $I_2$ ), 2 g Kalium Iodat (KI) dan 300 ml akuadest (Pelczar and Reid, 1958).

#### 3.4.4.2 Reagen *Congo Red*

Congo Red digunakan sebagai indikator untuk memastikan kemampuan suatu mikroba dapat menghidrolisa selulosa pada medium CMC dengan dibuktikan dengan terbentuknya zona bening setelah ditetesi *congo red* yang berkomposisi 0,1 g bubuk *congo red* dalam 100 ml pelarut alkohol 70% dan dihomogenkan (Pugh, 1974 cit. Ade, 2009).

#### 3.4.4.3 Buffer posfat borat, pH 8

Larutkan 2,90 gram borat ( $H_3BO_3$ ; Merck), 15,34 gram dinatrium hydrogen posfat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ; Merck) dan 30,7 gram trinatrium sitrat dihidrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ; Merck) kedalam 800 ml aquades, pH disesuaikan 8, lalu diencerkan menjadi 1000 ml (Stellmach, 1988).

#### 3.4.4.4 Substrat

Casein (Merck) sebanyak 2 gram dimasukkan kedalam 100 ml buffer posfat borat, didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya tambahkan 880 ml aquades dan panaskan pada suhu  $37^\circ C$  selama 45 menit. Tambahkan NaOH 1N



atau asam klorida 1N sampai pH menjadi 7,4. Setelah dingin tambahkan aquades sampai 1000ml (Stellmach, 1988).

#### 3.4.4.5 Buffer asetat, pH4

Larutkan 60 gram Natrium Asetat Trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; Merck) kedalam 700 ml aquades , tambahkan Asam Asetat pekat hingga pH menjadi 4, lalu encerkan dengan aquades sampai 1000 ml (Stellmach, 1988).

#### 3.4.4.6 Reagen Folin Ciocalteus Phenol

Folin Ciocalteus Phenol diencerkan dengan aquades dengan perbandingan volume 1 : 2 (Stellmach, 1988).

#### 3.4.4.7 Enzim

Ekstrak enzim dilarutkan kedalam aquades kemudian di sentrifus, lalu diambil supernatannya. Konsentrasi larutan diatur sehingga absorbannya berada antara 0,3 sampai 0,5 (Stellmach, 1988).

### 3.4.5 Pembuatan Larutan Pereaksi

#### 3.4.5.1 Larutan Nelson

Reagen Nelson dibuat dengan mencampurkan 25 bagian A dengan 1 bagian B.

- Larutan A : Sebanyak 12,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat, 12,5 g Kna tertarat, 10 g  $\text{NaHCO}_3$  dan 100 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat dilarutkan dalam 500 ml aquadest. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan kedalam botol gelap dan disimpan di lemari pendingin.

- Larutan B : Sebanyak 7,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 50 ml aquades dan ditambahkan 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , selanjutnya larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol gelap dan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.4.5.2 Larutan Arsenomolibdat

2,5 g ammonium molibdat dilarutkan dalam 45 ml aquadest. Larutan ditambahkan 2,5 ml asam sulfat dan dihomogenkan. Kemudian larutan ditambahkan 0,3 g disodium hidrogen arsenat yang telah dilarutkan dalam 25 ml aquadest. Larutan dihomogenkan dan inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam sampai 48 jam.

#### 3.4.5.3 Pembuatan kurva baku glukosa

Disiapkan empat tabung reaksi dan diisi dengan 1 ml larutan glukosa standar konsentrasi 0, 200, 400, dan 600 ppm. Satu ml aquadest dimasukkan ke dalam satu tabung sebagai blanko. Ke dalam masing-masing tabung di atas ditambahkan 1 ml reagensi Nelson dan dipanaskan kembali dalam air dengan suhu  $40^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Selanjutnya semua tabung didinginkan dengan air dingin hingga suhu tabung mencapai  $25^\circ\text{C}$ . Setelah dingin, ditambahkan 1 ml reagen fosfomolibdat dan di kocok hingga homogen. Setelah semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larutan sempurna, ditambahkan 7 ml aquades dan dikocok hingga homogen. Masing-masing larutan kemudian ditera absorbannya pada panjang gelombang 540 nm. Untuk setiap konsentrasi larutan glukosa ( $\mu\text{g/ml}$ ) akan diperoleh harga absorbansinya yang dilanjutkan pembuatan kurva baku glukosa (Sudarmadji, Haryono, dan Suhardi, 1984).



#### 3.4.5.4 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Glukosa anhidrat 100 mg dilarutkan dalam 100 ml aquadest kemudian diaduk sampai homogen. Dari larutan glukosa standar dilakukan empat pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, dan 600 µg/ml (Sudarmadji, Haryono, dan Suhardi, 1984).

#### 3.4.6 Tahap Pelaksanaan

##### 3.4.6.1 Isolasi mikroflora normal dari pencernaan ikan kerapu bebek (*C. altivelis*)

Ikan Kerapu Tikus dibedah secara aseptis untuk diambil organ pencernaannya berupa pencernaan besar. Pencernaan besar yang dikuras adalah yang berjarak sekitar 3cm dari anus dan dikuras isinya dan ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam tes tube dan volumenya dicukupkan sampai 10 ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ . masing-masing diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1ml dan dimasukkan kedalam cawan petri, cawan petri di tuang medium GTA+CaCO<sub>3</sub> dan SMA. GTA+CaCO<sub>3</sub> digunakan untuk melihat pertumbuhan mikroba pemfermentatif, sementara medium SMA digunakan untuk melihat pertumbuhan mikroba proteolitik.

Cawan petri digoyang hingga rata dan dibiarkan beku. Kemudian cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 38 °C. amati setiap 12 jam sekali untuk melihat zona bening (halozone). Zona bening yang di ambil nantinya pada masing-masing petri ada dua yaitu zona bening yang berukuran besar yang memiliki wilayah koloni besar dan wilayah koloni kecil.

#### 3.4.6.2 Penghitungan Populasi bakteri

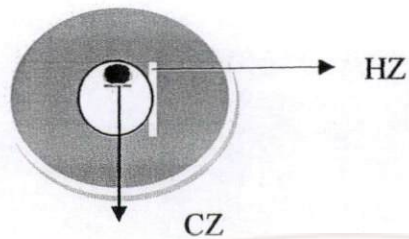
Penghitungan populasi bakteri secara *pourplate*. masing-masing medium SMA dan GTA+CaCO<sub>3</sub> di hitung dengan melakukan pengenceran sampai dengan 10<sup>-11</sup>. Kemudian pada 3 seri pengenceran terakhir diambil 1 ml, dimasukkan kedalam petri dan dituangkan medium GTA+CaCO<sub>3</sub> dan medium SMA yang hampir beku, digoyang hingga rata dan dibiarkan beku. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Setelah itu diamati zona bening (halozone) yang terbentuk lalu koloni yang terbentuk dihitung dengan colony counter. Jumlah koloni yang dihitung dengan kisaran 30-300 koloni tiap petridish. Kemudian mengalikan jumlah koloni yang didapat dikalikan dengan angka pengenceran, dengan satuan colony forming unit's (cfu) (Waluyo, 2007).<sup>1</sup>

#### 3.4.6.3 Penghitungan indeks Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek

Isolat Proteolitik dan Isolat Pemfermentasi yang telah di dapatkan di uji dengan beberapa jenis medium di antara nya medium GTA+CaCO<sub>3</sub>, medium SMA, CMC dan APB.

Penghitungan Indeks Proteolitik (IP), Indeks pemfermentasi (IF) , indeks selulolitik (IS) dan Amilolitik (IA) dilakukan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan mikroflora indigenous dapat mendegradasi protein, amilosa dan selulosa yang terdapat pada saluran pencernaan ikan kerapu bebek.





Penghitungan Indeks Proteolitik (IP), Indeks Pemfermentasi (IF), Indeks Amilolitik (IA) dan Indeks Selulolitik (IS) mikroflora indigenous ditentukan dengan rumus :

$$(IS) (IA) (IP) \text{ atau } (IF) = \frac{HZ}{CZ} \quad (\text{Jamilah et al., 2009})$$

Keterangan	IP	: Indeks Proteolitik
	IF	: Indeks Pemfermentasi
	IS	: Indeks Selulolitik
	IA	: Indeks Amilolitik
	HZ	: Diameter Daerah Halo
	CZ	: Diameter Koloni

#### 3.4.6.4 Uji makroskopis dan mikroskopis isolat mikroflora Indigenous pencernaan ikan Kerapu Bebek

##### 3.4.6.4.1 pewarnaan gram

Dua macam isolat yang di peroleh dari pencernaan ikan Kerapu Tikus , dilakukan pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan gram terhadap bakteri proteolitik dan bakteri pemermentasi. Diambil 1 ose biakan bakteri uji dan ratakan pada gelas objek, kemudian ditetaskan aquades, dan difiksasi diatas nyala lampu spiritus, setelah difiksasi selanjutnya ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir, kemudian dituangkan lugol dan biarkan

selama 1 menit, selanjutnya dibilas dengan air yang mengalir, setelah itu dilunturkan dengan alkohol 96% selama 10-20 detik sampai sisa zat hilang dan bilas dengan air mengalir, tambahkan safranin pada sediaan dan biarkan selama 10-30 detik dan bilas dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa safranin dari objek glass. Kemudian keringkan objek glass, lalu dilihat di bawah mikroskop. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan permukaan koloni dari masing-masing isolat (Tarigan, 1988).

#### 3.4.6.4.2 uji katalase

Satu ose dari masing-masing isolat bakteri diletakkan pada kaca objek, kemudian ditetesi dengan  $H_2O_2$ . Lihat terbentuknya gelembung udara pada permukaan koloni bakteri (Syulasmi *et al.*, 2008 *cit*, Dewi, 2011).

#### 3.4.6.4.3 Reaksi Terhadap Pewarnaan Endospora

Isolat bakteri diambil secara aseptik dengan menggunakan jarum ose. Dibuat preparat ulas pada gelas objek yang terlebih dahulu disterilkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades, kemudian difiksasi diatas nyala bunsen sampai kering. Preparat ditutup dengan kertas yang mudah menyerap air, kemudian diletakkan diatas air mendidih selanjutnya ditetesi larutan pewarna malachite green berlebihan selama lebih kurang 10 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit. Setelah dikering anginkan selanjutnya ditetesi larutan safranin selama 1 menit lalu dibilas dengan air dan dikering anginkan. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat. Sebagai indikasi



terdapatnya endospora akan berwarna hijau, dan bagian sel yang tidak memiliki endospora akan berwarna terang (Madigan *et al.*, 1995).

#### 3.4.6.4.4 Motilitas

Masing-masing isolat bakteri yang didapatkan diinkubasi pada medium Nutrient Agar Semisolid. Inkubasi pada suhu optimum dan amati pertumbuhan bakteri (Lay, 1994).

#### 3.4.6.4.5 Uji KOH

Dibuat preparat lalu ditetesi 2 tetes KOH. Aduk dengan jarum ose dengan sekali-sekali mengangkat keta jarum ose. Amati apakah isolat yang didapatkan berlendir atau tidak.

#### 3.4.6.5 Aktivitas Enzim

##### 3.4.6.5.1 protease

Aktifitas enzim protease diukur dengan metoda Northrop, dimana 50 ml larutan substrat dipipet kedalam labu Erlenmeyer 125 ml, ditutup dan dipanaskan dipenangas air pada suhu 37 °C, tambahkan 1 ml larutan enzim, campuran diinkubasi selama 25 menit pada suhu 37 °C. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan buffer asetat 25 ml lalu disaring. Pipet 2 ml dari filtrat tersebut dan tambahkan 3 ml NaOH ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Lalu tambahkan 1 ml Folin Ciocalteus Phenol. Setelah 10 menit, baca absorbansi pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktifitas enzim atau NU (Eine

Northrop-Unit) setara dengan jumlah enzim yang bisa menghidrolisis 40% dari larutan casein 20% (stellmach, 1988).

Perhitungan :

$$NU / g = \frac{E_{660} \cdot F}{E_w}$$

Keterangan :

E 660 = absorban pada 660 nm

E<sub>w</sub> = enzim dalam gr/ml larutan

F = faktor, rasio pengembangan warna reagen folin ciocalteus phenol dan protease hidrolase, untuk protease bakteri faktornya 200.

Tabel 1. Perbedaan prosedur aktivitas enzim protease blanko dan sampel

	Sampel	Blanko
Substrat (40 °C)	50 ml	50ml
Enzim	1 ml	-
Aquades	-	1 ml
Buffer asetat	-	25 ml
Homogenkan dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 25 menit		
Buffer asetat	25 ml	-
Homogenkan dan disaring, lalu ambil filtratnya 2 ml		
NaOH	3 ml	3 ml
Folin Ciocalteus Phenol	1 ml	1 ml
Homogenkan dan diamkan selama 10 menit pada suhu kamar, absorbansi dibaca pada panjang gelombang 660 nm		

#### 3.4.6.5.2 Selulase

Larutan CMC 1% sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipreinkubasikan pada suhu 40°C selama 5 menit kemudian dimasukkan larutan



ekstrak kasar enzim yang sebanyak 1 ml dan diinkubasikan pada suhu 40°C selama 30 menit. Campuran tersebut kemudian dimasukkan kedalam air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan dengan reagen Nelson sebanyak 1 ml. Selanjutnya divortex dan dipanaskan lagi pada air mendidih selama 20 menit. Larutan didinginkan segera dalam air es hingga suhunya mencapai 26°C lalu ditambahkan reagen fosfomolibdat sebanyak 1 ml dan dikocok segera sampai semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut sempurna. Selanjutnya dicukupkan volume larutan menjadi 10 ml dengan aquadest. Campuran larutan tersebut dikocok kembali hingga tidak ada gelembung udara lagi dan selanjutnya dilakukan pengukuran absorban dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perlakuan kontrol sama dengan perlakuan sampel, hanya pada kontrol enzim, 1 ml ekstrak kasar enzim yang digunakan terlebih dahulu dinonaktifkan dengan cara memanaskan air mendidih selama 20 menit tanpa penambahan substrat larutan CMC 1% sedangkan untuk kontrol substrat, 1 ml larutan CMC 1% sedangkan untuk kontrol substrat. 1 ml larutan CMC yang telah dipreinkubasikan pada suhu 40°C selama 5 menit, kemudian diinkubasikan kembali pada suhu ruangan selama 30 menit, kemudian perlakuan dilanjutkan tetapi tanpa penambahan ekstrak enzim. Aktivitas selulase (unit/ml) dapat dihitung dengan rumus :

$$AE = \frac{MG}{t}$$

Dimana :

AE = Aktivitas Enzim (unit/ml)

MG = Berat Glukosa ( $\mu\text{g/ml}$ )

t = Lama inkubasi (menit)

Satu unit dari aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah yang dibutuhkan untuk menghasilkan glukosa sebanyak  $1\mu\text{g/ml}$  substrat CMC per menit dengan perlakuan inkubasi 30 menit selama  $40^{\circ}\text{C}$  (Sudarmadji *et al.*, 1984).

#### 3.4.6.5.3 Amilase

Prosedur kerja pengukuran aktivitas amilase sama seperti pengukuran aktivitas selulase, namun sebagai larutan standarnya di ganti dengan pati standar 1% pada aktivitas amilase.

#### 3.4.6.6 Persiapan Larutan Induk

Masing-masing isolat yang telah didapat di ambil satu ose dimasukkan kedalam 9ml aquades steril yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian di vortex.

#### 3.4.6.7 Persiapan Starter Cair

Starter cair merupakan media yang bertujuan untuk memperbanyak mikroflora dalam bentuk cair sekaligus mengaktifkan isolat mikroflora. Di ambil 2 ml larutan induk dan masing-masing dimasukkan ke dalam medium cair GT, Skim Milk, CMC, APB kemudian disterilkan dalam erlemeyer yang volume nya di cukupkan menjadi 200 ml. Lakukan penggoyangan / seker agar terjadi pembelahan sel bakteri yang optimal didalam medium cair tersebut, cuplik sekali 6 jam untuk kemudian dihitung total mikroflora indigenous, nilai pH, kadar gula dan aktivitas enzimnya.

#### 3.4.6.8 Penghitungan Kadar Gula

Penghitungan kadar masing-masing medium cair yang telah berisi isolat proteolitik dan pemfermentasi dilakukan dengan menggunakan Refraktometer. Masing-masing medium cair tersebut dimasukan ke dalam tabung *Eppendorf* dan



disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit sampai bagian natan dan supernatan terpisah. Cairan sampel hasil sentrifus diteteskan pada permukaan Refraktometer. Bagian batas gelap dan terang Refraktometer diatur sehingga batasnya terlihat dengan jelas. Selanjutnya batas yang terlihat antara gelap dan terang, dibaca pada skala batas tersebut. Skala tersebut menunjukkan kadar gula yang terdapat pada sampel (Schmidt dan Haensch, 2006).

#### 3.4.6.9 Nilai pH

Pengamatan nilai pH dilakukan pada setiap sampel larutan stok Skim Milk, Pati, dan CMC sekali 6 jam menggunakan pH meter digital Corning Pinnacle 530 yang sebelumnya sudah distandarkan dengan larutan buffer (pH 4 dan pH 7).

### 3.5 Pengamatan

#### 3.5.1 Isolasi dan Perbanyakan Isolat Mikroflora Indigenus

Pengamatan isolasi dan perbanyakan dilakukan melalui permukaan koloni dan daerah halo dari isolat mikroflora indigenus yang dibentuk pada medium GTA +  $\text{CaCO}_3$ , dan SMA, diameter daerah halo terbesar diperbanyak pada medium miring NA modifikasi. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 48 jam.

#### 3.5.2 Keberadaan dan Karakteristik Mikroflora Indigenus pencernaan ikan Kerapu Bebek

Pengujian keberadaan dan karakteristik mikroflora indigenus pencernaan ikan Kerapu Bebek dilakukan melalui koloni dan daerah halo yang terbentuk dari isolat mikroflora indigenus yang dibentuk pada medium GTA +  $\text{CaCO}_3$ , dan SMA, dan dilakukan pengukuran diameter daerah halo yang terbesar dari setiap

isolat . Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 48 jam (Periadinadi dan Nurmiati, 2010).

### 3.5.3 Indeks Amilolitik dan Indeks Selulolitik Mikroflora Indigenous

Penghitungan Indeks Amilolitik (IA), Indeks Selulolitik (IS), Indeks Proteolitik (IP), dan Indeks Pemfermentasi (IF) dilakukan dengan mencari rasio antara diameter daerah bening (*halozone*) yang dibentuk oleh koloni bakteri dengan diameter koloni bakteri tersebut (Jamilah *et al.*, 2009).

### 3.5.4. Aktivitas bakteri

Aktivitas bakteri di ukur dari daerah halo pada masing-masing medium SMA dan GTA+CaCO<sub>3</sub>. Medium SMA untuk mengetahui aktivitas bakteri proteolitik, sedangkan medium GTA+CaCO<sub>3</sub> digunakan untuk mengetahui aktivitas bakteri pemfermentasi. Daerah halo yang memiliki bentuk yang bulat dan berdiameter terbesar itu yang nantinya akan di gunakan untuk isolat. Total mikroflora indigenous dihitung secara *pourplate* pada media SMA dan GTA + CaCO<sub>3</sub> menggunakan metoda pengenceran sampai dengan pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-11}$  Penghitungan total mikroflora dilakukan dengan *colony counter* pada akhir inkubasi setelah 48 jam inkubasi (Waluyo, 2007).

### 3.5.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan masing-masing bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi dilakukan dengan menghitung jumlah bakteri sekali 6 jam. Pada saat fase kurva pertumbuhan tertinggi itulah nanti yang akan digunakan untuk pencampuran ke pakan ikan Kerapu Bebek.



### 3.5.6 Kadar gula

Pengamatan nilai kadar gula dilakukan pada setiap sampel larutan stok Skim Milk, Glukosa tripton, Pati beras dan CMC sekali 6 jam dengan menggunakan refraktometer (Schmidt dan Haensch, 2006).

### 3.5.7 Nilai pH

Pengukuran nilai pH dilakukan pada setiap sampel dengan menggunakan pH meter yang sebelumnya sudah distandarkan dengan larutan buffer (pH 4 dan pH 7).

### 3.5.8 Aktivitas Enzim Bakteri Proteolitik dan Bakteri Pemfermentasi

Pada bakteri proteolitik diukur aktivitas enzim protease dengan menggunakan metode Nurthrop. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm. Sedangkan pada bakteri pemfermentasi diukur aktivitas enzim amilase dan selulase dengan menggunakan metode Somogy-Nelson. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

### 3.5.9 Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek

Pengamatan makroskopis dilihat dari daerah halo isolat yang dibentuk pada medium GTA +  $\text{CaCO}_3$  dan SMA, diamati bentuk, warna dan permukaan koloni, sedangkan mikroskopis dilakukan melalui pewaranaan Gram dimana bakteri Gram positif akan bewarna ungu sedangkan Gram negatif bewarna merah.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dalam bentuk deskriptif. Adapun parameter yang dianalisa adalah total bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek, kurva pertumbuhan, Indeks Proteolitik, Amilolitik dan Indeks Selulolitik masing-masing isolat, nilai pH, kadar gula, aktifitas enzim amilase, selulase, dan protease.





#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai potensi dan karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) sebagai kandidat probiotik pakan ikan, didapatkan hasil penelitian berikut :

##### 4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek Kandidat Probiotik

Bakteri alami atau mikroflora indigenous merupakan bakteri (primitive) alami yang terdapat pada suatu ekosistem tertentu contohnya pada pencernaan ikan. Pencernaan ikan memiliki bakteri alami yang keberadaannya telah ada sejak ikan tersebut menetas dari telurnya dan berkembang. Keberadaan bakteri alami pencernaan memiliki peranan penting dalam efisiensi pakan agar pakan tercerna dengan baik. Bakteri alami pencernaan mempunyai potensi sebagai kandidat probiotik karena kemampuannya untuk menghidrolisis bahan organik yang terdapat pada pakan seperti karbohidrat, protein dan lemak. Bahan-bahan organik tersebut akan diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana contohnya karbohidrat akan dirubah menjadi gula sederhana.

Hal diatas sesuai dengan pernyataan Feliatra *et al.*, (2004) bahwa prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-

enzim pencernaan yang dimiliki oleh mikroba untuk memecah ikatan tersebut. Enzim tersebut biasanya tidak dimiliki oleh ikan dan makhluk air lainnya.

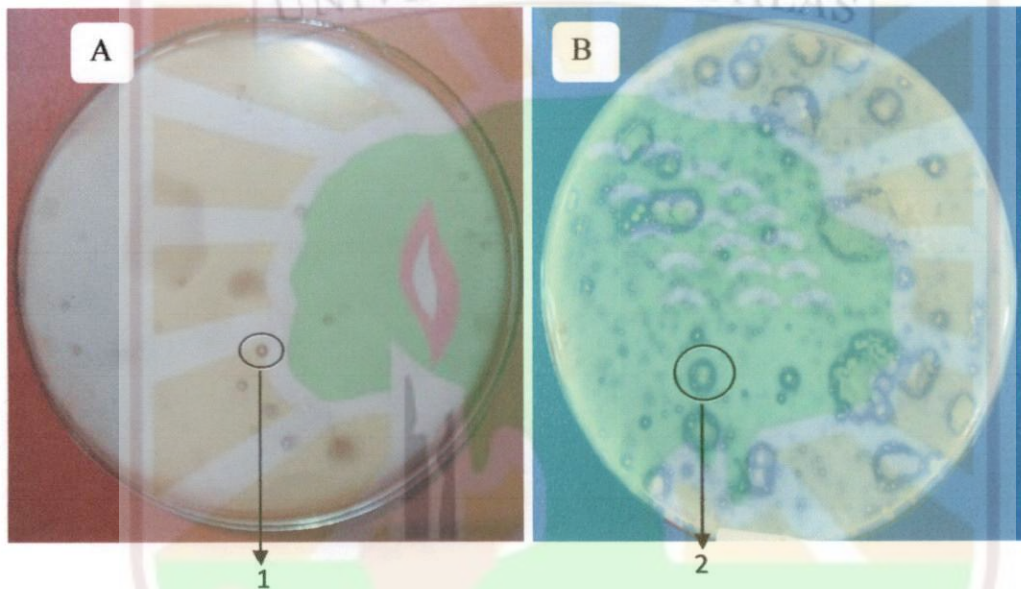


Gambar 3 : Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) yang dikembangkan di Balai Benih Ikan Pantai Teluk Buo Bungus Padang Sumatera Barat

Kandidat bakteri probiotik di isolasi dari pencernaan ikan kerapu bebek yang berukuran panjang 8-9 cm dan nantinya akan ditambahkan ke pakan ikan itu sendiri agar terjadinya keseimbangan mikroflora normal didalam pencernaan. Seperti yang dinyatakan oleh Fuller (1987) *cit* Feliatra (2004) bahwa probiotik merupakan makanan tambahan berupa sel-sel mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba intestinalnya . Selanjutnya Soeharsono (2010) juga menyatakan bahwa probiotik memiliki fungsi yang sama dengan antibiotik yakni meningkatkan laju pertumbuhan dan meningkatkan kesehatan. Perbedaannya



ialah antibiotik merupakan zat kimia yang diserap di dalam pencernaan, dapat menimbulkan residu dalam jaringan, dan dapat menyebabkan adanya mutasi mikroorganisme, sedangkan probiotik merupakan mikroorganisme hidup, tanpa menyebabkan residu dan mutasi, karena kerjanya hanya mendesak mikroorganisme patogen keluar dari dalam tubuh.



Gambar 4. Daerah halo yang terbentuk dari keberadaan bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek. (1) bakteri pemfermentasi dalam medium GTA+CaCO<sub>3</sub>, (2) bakteri proteolitik dalam medium Skim milk agar.

Dalam penelitian ini isolasi dan seleksi terhadap bakteri kandidat probiotik ikan kerapu bebek dilakukan dalam medium GTA+CaCO<sub>3</sub> dan SMA. Menurut Periadnadi dan Nurmiati (2010) Adanya mikroflora indigenous dibuktikan dengan penambahan kalsium karbonat (CaCO<sub>3</sub>) dalam medium Glukosa Tripton Agar (GTA) dengan terbentuknya daerah halo (*halozone*) sebagai hasil dari hidrolisa mikroflora tersebut terhadap asam. Kalsium karbonat berfungsi dalam menetralkan kapur yang ada pada daerah koloni sehingga terbentuklah daerah halo. Medium GTA+CaCO<sub>3</sub> digunakan untuk melihat bakteri pemfermentasi

yang memiliki potensi sebagai bakteri asam laktat. Sedangkan medium SMA digunakan untuk melihat bakteri proteolitik yang memiliki potensi sebagai bakteri pembusuk. Kehadiran bakteri alami yang terdapat dalam pencernaan ikan kerapu bebek dapat dilihat pada Gambar 4 setelah inkubasi 2 hari.

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa terdapat adanya bakteri alami dalam pencernaan ikan kerapu bebek. Kehadiran bakteri alami didapatkan setelah proses isolasi mikroflora indigenous yang dilakukan secara aseptis. Pembuktian bakteri alami yang ada pada pencernaan ikan kerapu bebek ditanam pada medium Glukosa Tripton Agar Kalsium Karbonat dan Skim Milk Agar dapat dibedakan dengan kontrol dari perlakuan, dimana pada medium kontrol tidak ditemukan mikroba kontaminan yang tumbuh. Bakteri alami yang terdapat pada pencernaan ikan kerapu bebek memperlihatkan karakteristik berbeda. Hal tersebut dapat dibuktikan dari ukuran daerah halo yang dihasilkan oleh bakteri alami pada masing-masing medium. Besarnya kemampuan suatu mikroflora dalam mendegradasi suatu substrat tertentu dapat dilihat dari besar daerah halo yang dihasilkannya, semakin besar daerah halo yang dihasilkan suatu mikroflora maka semakin besar kemampuannya dalam mendegradasi substrat tertentu. Total serta kemampuan bakteri alami yang terdapat pada pencernaan ikan kerapu bebek pada masing-masing medium menunjukkan nilai yang berbeda-beda. Setelah dilakukan penghitungan total jumlah bakteri yang tumbuh pada masing-masing medium didapatkan proporsional antara bakteri proteolitik dan pemfermentasi yaitu 3:1 seperti yang terlihat pada tabel dibawah ini



Tabel 2. Total Bakteri Alami Dalam Pencernaan Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*)

No	Jenis isolat bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek	Total mikroflora Indigenous (cfu/g)
1.	Bakteri proteolitik	$31 \times 10^{11}$
2.	Bakteri pemfermentasi	$103 \times 10^{10}$

Berdasarkan tabel di atas dapat total bakteri alami dalam pencernaan ikan Kerapu Bebek. Setelah diambil 1gr isi pencernaan ikan kerapu bebek dan dilakukan pengenceran  $10^5 - 10^{13}$  maka didapatkan total bakteri proteolitik lebih dominan dari pada bakteri pemfermentasi, dimana total bakteri proteolitik yaitu  $31 \times 10^{11}$  cfu/gr sedangkan bakteri pemfermentasi  $103 \times 10^{10}$  cfu/gr sehingga didapatkan perbandingan proporsional 3:1. Hal ini sesuai dengan perilaku makan ikan kerapu bebek yang lebih cenderung memakan makanan dengan kadar protein yang tinggi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Fauzi *et al* (2008) bahwa pakan yang digunakan untuk budidaya ikan kerapu ada dua jenis pakan yaitu pakan segar berupa ikan rucah dan/atau pakan buatan berupa pelet.

Daerah halo terbesar akan di ambil untuk di strip pleat pada cawan petri yang berisi medium GTA+CaCO<sub>3</sub> untuk bakteri pemfermentasi dan SMA untuk bakteri proteolitik. Koloni tunggal yang tumbuh nantinya kemudian akan diisolasi ke biakan miring dengan cara strip pleat. Medium yang digunakan untuk biakan miring tahap pertama adalah GTA+CaCO<sub>3</sub> untuk bakteri pemfermentasi dan Skim Milk Agar untuk bakteri proteolitik. Hal ini dilakukan agar bakteri yang telah didapatkan tersebut dapat menyesuaikan diri . Setelah hal tersebut dilakukan

baru masing-masing bakteri di pindahkan kedalam medium Natrium Agar. Berikut adalah Gambar isolat bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek yang digunakan.



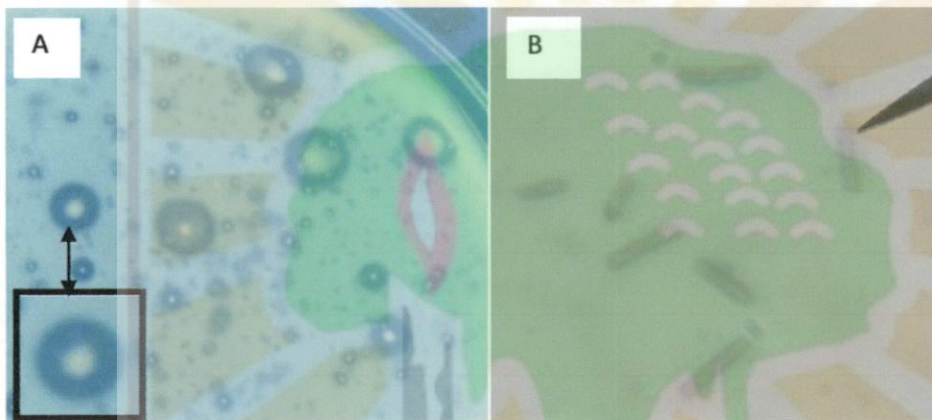
Gambar 5. A. Isolat bakteri proteolitik, B. Isolat bakteri Pemfermentasi

Untuk mengeksplorasi proses biologis dari masing-masing isolat bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek yang didapatkan, terutama dalam pendegradasian zat organik seperti amilum dan selulosa, dilakukan pengujian potensi amilolitik dengan menggunakan medium Agar Tepung Beras (ATB) dan juga kemampuan selulolitik dengan menggunakan medium Carboxy Methyl Celulose (CMC). Uji masing – masing isolat bakteri alami terhadap potensi amilolitik, selulolitik dan degradasi asam akan didapatkan dari diameter daerah halo yang dihasilkan.

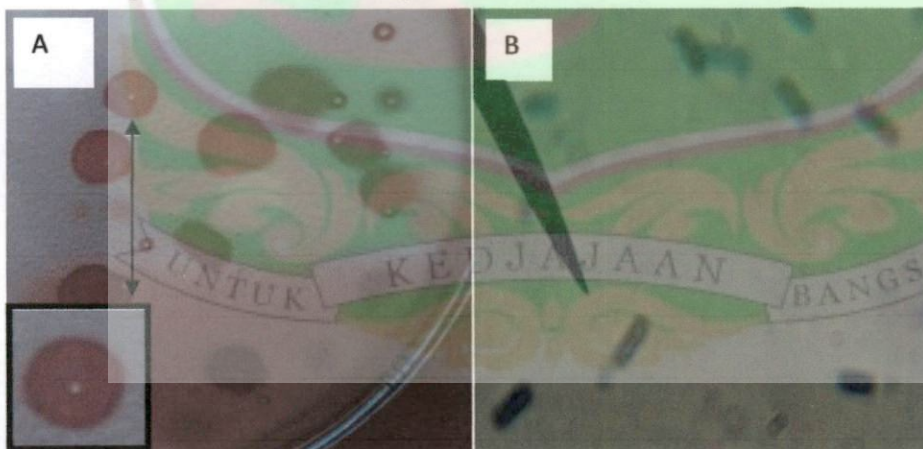


#### 4.2 Karakteristik bakteri alami pada pencernaan ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*)

Berdasarkan pengamatan makroskopis terhadap bentuk, warna, permukaan dan pinggir koloni masing-masing isolat pada medium GTA+CaCO<sub>3</sub> dan SMA juga dari pengamatan mikroskopis terhadap bentuk sel isolat setelah pewarnaan Gram didapatkan hasil seperti Gambar 6 dan 7 di bawah.



Gambar 6. A. Koloni bakteri isolat proteolitik pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium Skim Milk Agar, B. Mikroskopis bakteri proteolitik pencernaan ikan Kerapu Bebek (10X100)



Gambar 7. A. Koloni bakteri isolat pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium GTA+CaCO<sub>3</sub>. B. Mikroskopis bakteri pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek (10X100).

Berdasarkan Gambar 6 dan 7 dapat dilihat bahwa masing-masing isolat bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi memiliki penampakan makroskopis dan mikroskopis yang berbeda-beda. Dimulai dari penampakan makroskopis, isolat proteolitik dan pemfermentasi yang memiliki ciri-ciri yang tidak sama. Isolat bakteri proteolitik memiliki karakteristik morfologi bentuk koloni bulat dengan permukaan licin dan cembung, pinggiran rata, dan warna koloni putih. Isolat bakteri pemfermentasi memiliki karakter morfologi bentuk koloni bulat dengan permukaan licin serta cembung, pinggiran rata, dan warna koloni putih kekuning.

Pada pengamatan mikroskopis bakteri proteolitik dilakukan dengan pewarnaan Gram terhadap isolat bakteri tersebut. Pewarnaan Gram dilakukan pada kultur bakteri umur 24 jam yang ditumbuhkan pada biakan miring medium NA. Didapatkan hasil dari pewarnaan tersebut bahwa bakteri proteolitik yang berasal dari pencernaan ikan kerapu bebek berbentuk batang panjang dan berwarna ungu. Warna ungu tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri proteolitik tersebut termasuk kedalam kelompok Gram positif. Sedangkan pada pewarnaan gram isolat bakteri pemfermentasi didapatkan bentuk sel bakteri yaitu batang pendek dan berwarna ungu.

Dari pewarnaan Gram yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa bakteri ini merupakan Gram positif yang mengikat kristal violet sehingga sel bakteri berwarna ungu dan sel bakteri terlihat berbentuk batang.

Uji lanjut mengenai karakterisasi mikroskopis telah dilakukan seperti uji katalase, Pewarnaan spora, uji KOH, dan motilitas. Seperti yang diungkapkan Rahayu & Margino (1997) bahwa untuk identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)



dilakukan berdasarkan pada karakteristik morfologi (bentuk sel), uji katalase, pewarnaan Gram, motilitas, dan tipe fermentasi Isolat murni yang menunjukkan kriteria katalase positif (+), Gram positif (+), dan non motil diidentifikasi sebagai BAL. Hasil uji mikroskopis yang telah dilakukan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 3. Hasil Uji makroskopis dan mikroskopiis bakteri proteolitik dan pemfermentasi

Pengujian	Jenis Isolat	
	Bakteri Proteolitik	Bakteri Pemfermentasi
Koloni		
Warna	Putih	Putih kekuningan
Bentuk	Bulat	Bulat
Pinggir	Rata, halus	Rata, halus
Permukaan	Cembung	Cembung
Sel		
Bentuk	Batang panjang	Batang pendek
Pengujian		
Pewarnaan gram	+	+
Uji katalase	+	+
Uji KOH	-	-
Pewarnaan spora	-	-
Motilitas	+	+

Uji mikroskopis yang telah dilakukan selanjutnya adalah uji katalase . Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan  $H_2O_2$  sebanyak 2 tetes pada masing-masing ulasan bakteri yang diletakkan di atas kaca objek. Dari uji yang dilakukan terlihat bahwa pada isolat bakteri proteolitik yang telah ditetaskan  $H_2O_2$  timbul

gelembung udara, dan pada isolat bakteri pemfermentasi yang juga ditetaskan  $H_2O_2$  juga timbul gelembung udara. Gelembung udara tersebut muncul dari penguraian  $H_2O_2$  oleh bakteri, dan hal ini menunjukkan bahwa pada uji katalase isolat proteolitik dan isolat pemfermentasi menunjukkan hasil positif. Menurut Fardiaz (1987), uji katalase digunakan untuk mengetahui adanya enzim katalase pada bakteri, dimana enzim ini berperan dalam memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji ini penting dilakukan untuk mengetahui sifat bakteri terhadap kebutuhan akan oksigen.

Uji KOH dilakukan untuk melihat sifat bakteri yang berlendir atau tidak . Pengujian ini dilakukan dengan cara meneteskan 1 atau 2 tetes KOH 3% pada preparat masing-masing biakan bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi. Dengan bantuan jarum ose suspensi masing-masing isolat yang telah ditetaskan KOH 3% tersebut ditarik keatas. Dari pengujian yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa setelah ditetaskan KOH 3% masing-masing bakteri tersebut baik bakteri proteolitik maupun bakteri pemfermentasi tidak menunjukkan perubahan seperti berlendir. Menurut Marlina (2009) Terbentuknya suspensi yang kental (seperti lendir) dan melengket pada jarum ose menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan apabila suspensi yang terbentuk adalah suspensi encer maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif. Untuk Gambar dapat dilihat pada lampiran 10.

Selanjutnya uji pewarnaan spora yang bertujuan untuk melihat kemampuan suatu bakteri dalam menghasilkan spora terutama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim. Menurut Hadioetomo (1985) Pewarnaan spora merupakan pewarnaan yang bertujuan melihat adanya suatu struktur di dalam sel bakteri yang disebut endospora. Jika sel semakin tua, maka sel vegetatif akan



pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi spora bebas. Berbeda dengan sel vegetatif, spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim. Pengujian ini dilakukan dengan cara meneteskan zat *Malachite Green* pada masing-masing biakan bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi berumur 1 minggu yang telah diratakan diatas kaca objek, setelah kering ditetaskan safranin dan kemudian baru dicuci. Pada pengamatan yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa pada sel bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi berwarna merah namun sama-sama tidak terlihat terdapatnya spora dalam sel vegetatif maupun spora bebas di pengamatan mikroskop pada isolat proteolitik maupun isolat pemfermentasi . Menurut Sovi Dewi (2006) bakteri berspora akan memiliki endospora yang terdapat pada sel vegetatif maupun spora bebas yang berwarna hijau biru.

Uji motilitas merupakan uji yang digunakan untuk melihat sifat pergerakan bakteri yang dapat dilihat dengan pergerakan selnya. Sifat pergerakan ini biasanya ditandai dengan pertumbuhan yang menyebar atau tidak. Uji motilitas dilakukan secara aseptis dengan menusukkan jarum ose pada masing-masing kurtur isolat bakteri proteolitik dan pemfermentasi yang kemudian dicelupkan kedalam medium Nutrient Agar Semisolid dan diinkubasi pada beberapa hari. Dari uji motilitas yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa setelah beberapa hari inkubasi biakan bakteri yang ditusukkan menjauhi garis tusukan tersebut dan bermigrasi pada permukaan medium. Menyebarnya pergerakan bakteri dari bekas tusukan menandakan bakteri tersebut memiliki flagelum. Hal ini menandakan bahwa bakteri dari isolat proteolitik dan isolat pemfermentasi positif bersifat motil. Hal ini didukung oleh pendapat Pelczar dan Chan (1986) yang menyatakan bahwa bakteri seperti *Bacillus* dan *Spirillum* mempunyai flagellum

yang merupakan salah satu struktur utama di luar sel bakteri yang menyebabkan pergerakan (motilitas) pada sel bakteri. Untuk lebih jelasnya Gambar uji motilitas dapat dilihat pada lampiran 10.

Dari uji makroskopis dan mikroskopis yang telah dilakukan maka dapat dikatakan bahwa isolat bakteri proteolitik mengarah ke genus *Bacillus*. Ini terbukti dari pengamatan bentuk sel yang seperti batang panjang, gram positif, katalase positif, tidak berspora dan motil. Menurut Peleazar dan Chan (1988) *Bacillus* merupakan bakteri Gram positif, kemoorganotrof dengan sel berbentuk batang, panjang 0,3 2,2 pm x 1,27 7,0 rm sebagian besar motil dengan flagellum khas lateral. Membentuk endospora tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium. Metabolisme dengan respirasi sejati, fermentasi sejati atau kedua-duanya. Termasuk aerobik sejati atau anaerobik fakultatif. Hasil penelitian Rachmadi (2008) menyatakan beberapa bakteri proteolitik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan Nila GIFT ternyata mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* yang bersifat toksik bagi ikan lain. Oleh sebab itu, potensi diperolehnya kandidat isolat-isolat probiotik dari saluran ikan Nila GIFT cukup besar. Wizna (2007) menambahkan bahwa bakteri dari genus *Bacillus* dapat menghasilkan berbagai macam enzim seperti alfa amilase, selulase, hemiselulase, protease, urease, xylanase, dan khitinase. Bakteri yang menghasilkan enzim-enzim tersebut berpotensi sebagai kandidat probiotik karena enzim-enzim tersebut sangat bermanfaat bagi pencernaan hewan untuk efisiensi pakan. Hasil penelitian Feliatra *et al.*, (2012) melaporkan bahwa bakteri *Bacillus cereus* memberikan respon positif yaitu terbentuknya hambatan yang terjadi pada pertumbuhan bakteri *Aeromonas sp* dan *Vibrio sp* yang merupakan bakteri



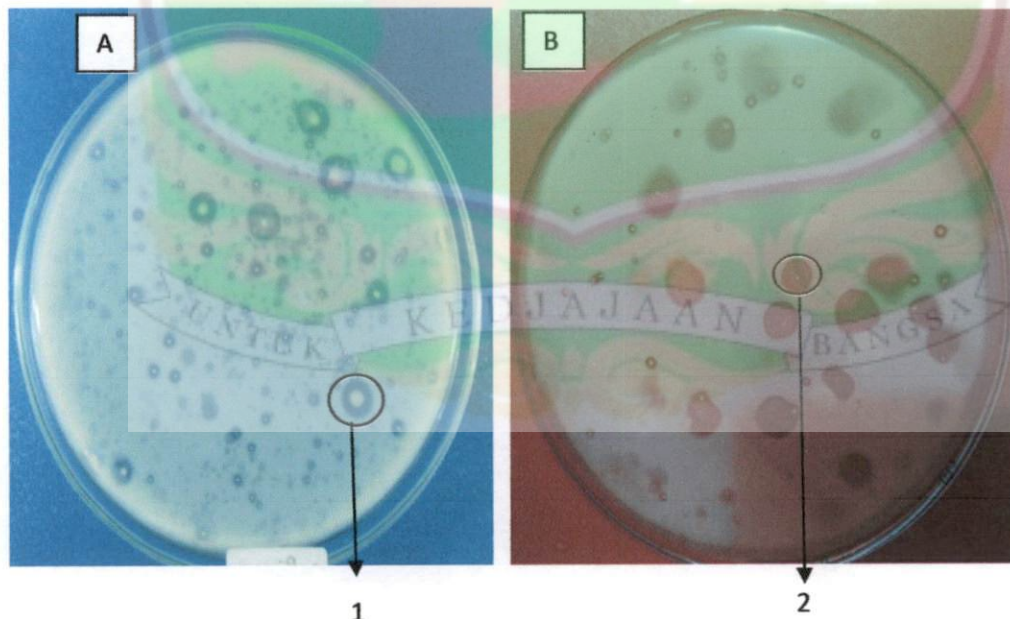
patogen pada ikan, respon ini terlihat dengan terbentuknya zona yang terputus oleh adanya pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*.

Isolat bakteri pemfermentatif memiliki bentuk sel seperti batang namun agak pendek jika dibandingkan bakteri proteolitik, gram positif, katalase positif, uji KOH negatif, tidak berspora dan juga motil. Dari karakteristik yang telah didapatkan tersebut maka bakteri tersebut juga mendekati genus *Bacillus*. Hasil penelitian Feliatra *et al.*, 2004 menunjukkan bahwa ikan kerapu macan memiliki 9 spesies bakteri yang berpotensi sebagai probiotik, yaitu *Lactococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, dan *Bifidobacterium sp.* Kesembilan bakteri ini berpotensi sebagai probiotik karena memiliki ketahanan pada pH 2 yang merupakan indikator utama sebagai bakteri probiotik. Bakteri pada genus *Bacillus*, *Bifidobacteri*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, dan *Micrococcus* telah terbukti sebagai bakteri yang menguntungkan dan dapat hidup berasosiasi sebagai flora normal pada organisme baik di dalam maupun di luar tubuh, sedangkan bakteri dari lainnya masih diduga sebagai bakteri probiotik yang menguntungkan. Bairagi *et al.*, (2004) juga menambahkan mikroba dari strain *Bacillus* yaitu *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* yang berasal dari pencernaan ikan nila dan ikan mas memiliki potensi sebagai kandidat probiotik karena kedua mikroba ini dapat memproduksi enzim amilase, selulase, protease dan lipase.

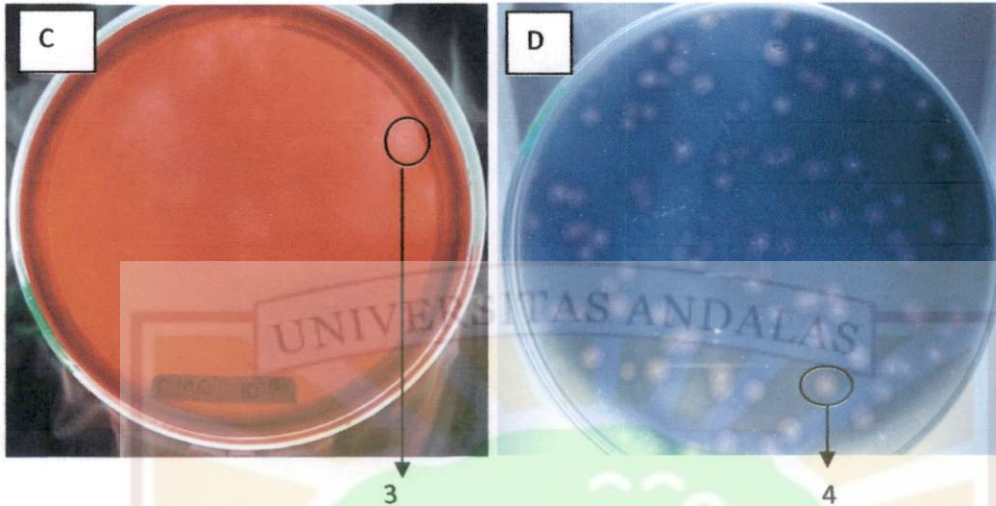
### 4.3 Potensi Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek

#### 4.3.1 Diameter Halozone Isolat Bakteri Alami Pencernaan Ikan Kerapu Bebek

Kemampuan isolat bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi dalam menghidrolisis suatu substrat tertentu berbeda-beda. Isolat pemfermentatif memiliki kemampuan dalam menghidrolisis asam pada medium GTA+CaCO<sub>3</sub>, pati pada medium ATB, dan selulosa pada medium CMC. Sedangkan bakteri proteolitik memiliki kemampuan sebagai bakteri menghidrolisis protein pada medium SMA. Besarnya kemampuan isolat bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi dapat dilihat dari diameter daerah halo yang dihasilkannya. Semakin besar daerah halo yang terbentuk maka aktivitas atau kemampuan bakteri dalam menghidrolisis substrat tertentu semakin besar. Untuk melihat kemampuan bakteri proteolitik dan pemfermentasi dalam menghidrolisis suatu substrat dapat dilihat pada gambar 8 berikut.

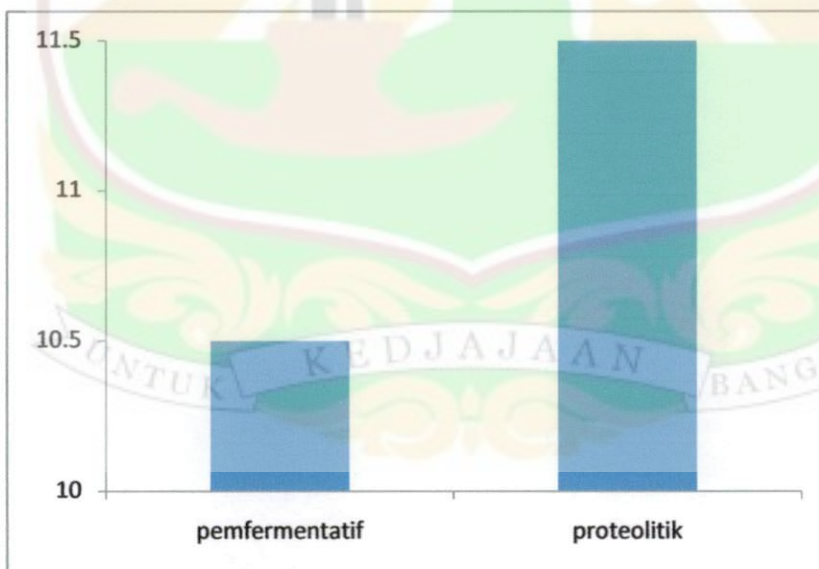






Gambar 8 . Koloni isolat bakteri pencernaan ikan Kerapu Bebek untuk pengukuran indeks proteolitik (A) pada medium SMA, indeks pemfermentasi (B) pada medium GTA, indeks Selulolitik (C) pada medium CMC, indeks Amilolitik (D) pada medium ATB.

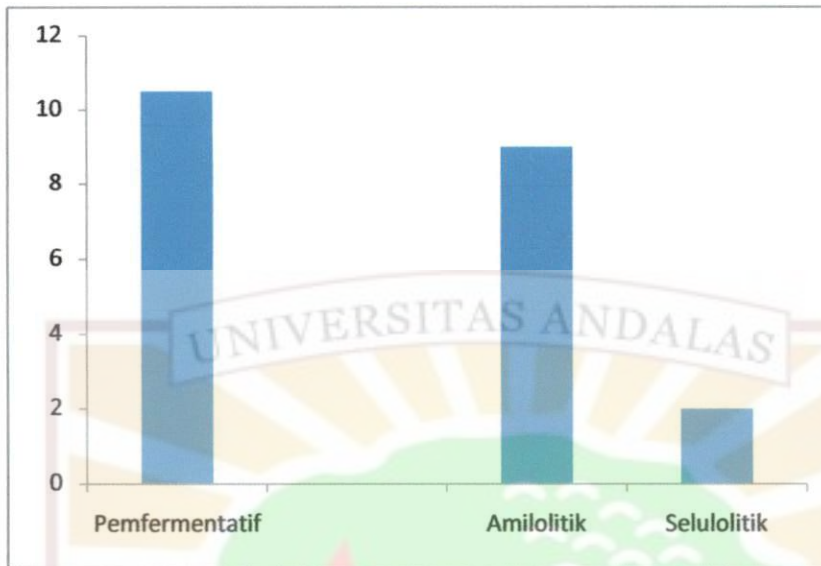
Penghitungan nilai indeks yang dihasil kan oleh bakteri proteolitik dan pemfermentasi lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 9 berikut.



Gambar 9. Indeks proteolitik dan indeks pemfermentasi bakteri-bakteri alami pencernaan ikan kerapu.

Pada gambar terlihat perbedaan indeks antara bakteri pemfermentasi dan bakteri proteolitik yang berasal dari pencernaan ikan Kerapu Bebek. Pengukuran nilai indeks bakteri proteolitik dilakukan pada medium Skim Milk Agar, didapatkan hasil pengukuran indeks pada daerah halo terbesar dan jelas yaitu 11,5. Sedangkan pengukuran nilai indeks pemfermentasi dilakukan pada medium GTA+CaCO<sub>3</sub>, dan didapatkan hasil pengukuran indeks pada daerah halo terbesar yaitu 10,5. Kemampuan bakteri proteolitik dalam membentuk daerah halo pada medium SMA menunjukkan bahwa bakteri proteolitik mempunyai kemampuan dalam mendegradasi protein susu yang ada pada medium SMA, dan pada pencernaan bakteri ini memiliki kemampuan sebagai bakteri pembusuk. Kemampuan isolat pemfermentasi dalam menghidrolisi asam dapat diindikasikan dengan penambahan kalsium karbonat pada medium Glukosa Trypton Agar (CaCO<sub>3</sub>). Kalsium karbonat merupakan zat indikator untuk menentukan suatu jenis bakteri yang mampu menghidrolisis asam. Hasil penelitian Yusmarini *et al.*, (2009) menyatakan kemampuan isolat R.1.3.2 untuk memproduksi enzim proteinase didasarkan atas diameter zona jernih pada media skim milk agar sedikit lebih besar dibandingkan dengan R.11.1.2.





Gambar 10. Indeks amilolitik dan selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri pemfermentasi

Pengukuran indeks yang dihasilkan oleh kemampuan bakteri pemfermentasi dilakukan pada 3 medium yaitu GTA+CaCO<sub>3</sub>, ATB, dan CMC. Didapatkan pada hasil pengukuran indeks terbesar pada medium GTA+CaCO<sub>3</sub> yaitu 10,5. Pada pengukuran nilai indeks amilolitik juga dilakukan pada daerah halozone terbesar yang hasilnya yaitu 9,0. Isolat bakteri pemfermentasi yang ditanam pada medium ATB secara umum memiliki kemampuan untuk menghidrolisis amilum atau pati. Degradasi yang terjadi pada pati diketahui dengan hilangnya material yang terwarnai oleh iodine dan untuk mendeteksi adanya enzim  $\alpha$  amilase yang berfungsi menghidrolisis  $\alpha$ -1,4-glikogen dan poliglukosa lainnya. Produk akhir yang utama dari degradasi ini adalah oligosakarida dengan berat molekul yang rendah seperti glukosa. Sebaliknya,  $\beta$ -amilase mampu mengkatalisis secara eksolitik dan mendegradasi pati dengan cara memecah maltosa dari ujung rantai pati.

Zona bening yang dihasilkan pada medium Agar Tepung Beras merupakan zona hasil dari pendegradasian amilum dalam medium tersebut. Adanya zona bening pada medium yang mengandung amilum mengindikasikan bahwa bakteri tersebut bersifat amilolitik. Zona bening yang terbentuk akibat bakteri mensekresikan enzim amilase pada medium Agar Tepung Beras dan menghidrolisis amilum sehingga partikel amilosa dan amilopektin menghilang maka terbentuklah gula sederhana. Gula- gula sederhana tidak akan menyerap warna biru dari zat iodine dari lugol, oleh karena itu terbentuklah zona bening.

Kehadiran enzim pengurai amilum (pati) dapat dideteksi dari hilangnya substrat pati yang diperjelas dengan pemberian Lugol's Iodine dimana Judoamodjojo *et al.*, (1989) *cit.* Handayani (2007) menambahkan bahwa hilangnya substrat dapat dilihat dari pengurangan derajat pewarnaan iodium terhadap substrat. Penguraian pati menjadi glukosa pada aktivitas amilolitik yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni bakteri merupakan suatu cara mikroba tersebut untuk mendapatkan bahan makanan, mereka mendapatkan sumber organik berupa karbon dengan pembentukan glukosa.

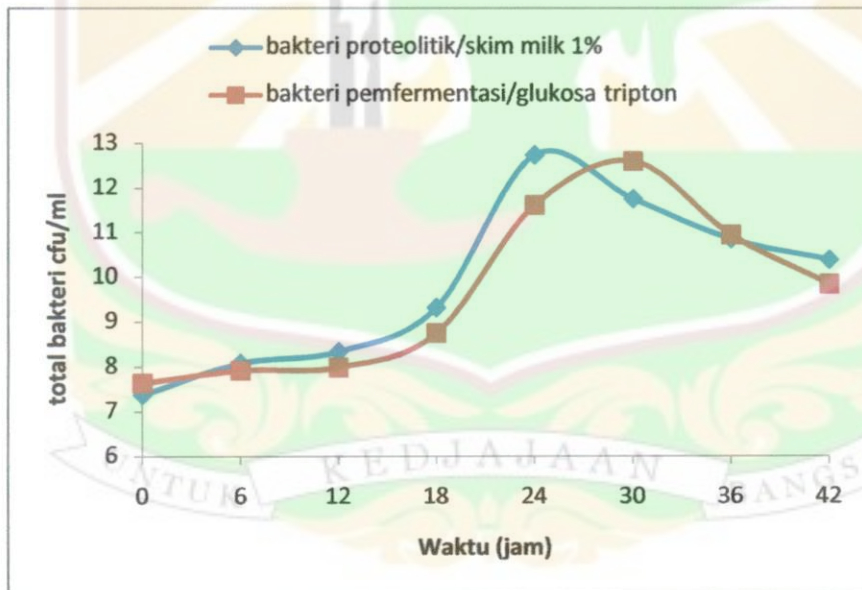
Potensi selulolitik yang diamati pada medium CMC (Carboxy Methyl Cellulose). memiliki nilai terendah jika dibandingkan dengan indeks amilolitik dan pemfermentasi. Nilai indeks selulolitik yang didapatkan yaitu 2. Carboxy methyl cellulose (CMC) adalah substrat yang digunakan dalam deteksi awal untuk screening enzim selulase khpencernaannya endoglukanase. Enzim selulase merupakan kelompok enzim glikosilhidrolase yang menghidrolisis oligosakarida dan polisakarida. Adanya zona bening yang dihasilkan bakteri pada medium Carboxy Methyl Selulose mengindikasikan bahwa bakteri dari isolat bakteri pemfermentasi ini bersifat selulolitik. Bakteri pemfermentasi mampu



menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi selulosa menjadi molekul yang lebih sederhana seperti glukosa . Bakteri ini menghasilkan enzim selulase dan disekresikan pada medium kemudian selulase menghidrolisis selulosa dan medium akan kelihatan bening (zona bening) sebagai hasil kerja dari enzim selulase.

#### 4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Peninjauan terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi dilakukan setiap 6 jam selama 42 jam. Profil pertumbuhan pada bakteri proteolitik dan bakteri pemfermentasi berbeda. Hal ini dapat ditandai terjadinya peningkatan setiap periodik pengamatan. Profil pertumbuhan dapat dilihat bahwa pada Gambar dibawah.



Gambar 11 . Pertumbuhan bakteri-bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam medium cair Skim Milk dan Glukosa Tripton (CFU/ml).

Pencuplikan terhadap medium cair Glukosa Tripton dan Skim Milk yang telah berisi masing-masing isolat proteolitik dan pemfermentatif dilakukan 6 jam selama 42 jam. Masing-masing pencuplikan kemudian dilakukan pengenceran  $10^5 - 10^{13}$ . Jumlah bakteri yang tumbuh pada tiap-tiap cawan petri dihitung dengan menggunakan rumus:  $A \frac{(C+F)}{H}$

dimana : A : jumlah pencuplikan (ml)

C : jumlah sel bakteri yang didapatkan

F : faktor pengenceran

H : total starter cair

Berdasarkan profil pertumbuhan diatas dapat dilihat bahwa setelah inokulasi terjadi peningkatan pertumbuhan bakteri yaitu pada jam ke-6 sampai pada jam ke-18 fase ini disebut juga dengan fase lag. Seperti yang diungkapkan Brock & Madigan (1991) bahwa pada fase lag terjadi sedikit pembelahan sel. Fase ini juga ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul, aktivitas metabolik, dan kerentanan terhadap zat kimia dan faktor fisik. Fase lag merupakan suatu periode penyesuaian yang sangat penting untuk penambahan metabolit pada kelompok sel, menuju tingkat yang setaraf dengan sintesis sel maksimum.

Barulah memasuki fase dengan kecepatan pertumbuhan yang sangat signifikan yaitu pada jam ke-24 bakteri proteolitik dengan total bakteri  $57 \times 10^{11}$  cfu/ml dan lebih cepat laju pertumbuhan bakteri proteolitik dibandingkan bakteri pemfermentasi dengan total bakteri  $42 \times 10^{10}$  cfu/ml. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan pertumbuhan bakteri pembusuk lebih cepat dibandingkan bakteri pemfermentasi. Pada jam ke-30 aktifitas pertumbuhan bakteri proteolitik mulai



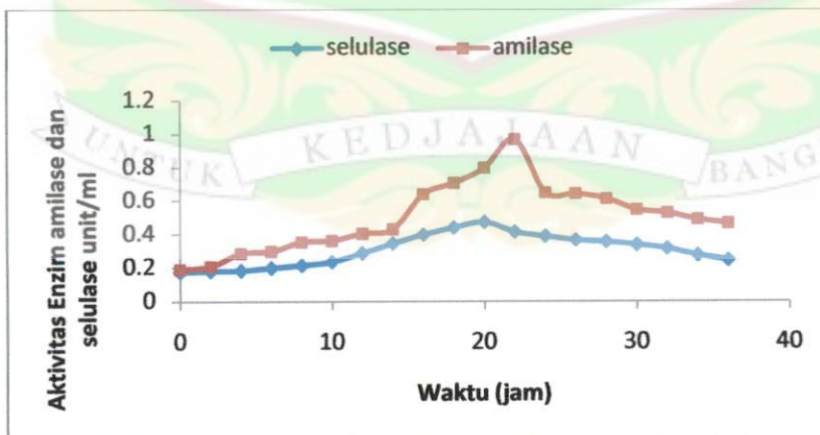
menurun yaitu  $58 \times 10^{10}$  Cfu/ml, namun pertumbuhan bakteri pemfermentasi justru semakin meningkat yaitu  $41 \times 10^{11}$  Cfu/ml. Dan pada jam ke-30 ini lah puncak pada pertumbuhan bakteri pemfermentasi.

Pada jam ke-36 baru lah terjadi penurunan pertumbuhan bakteri pemfermentasi, fase ini disebut juga fase stasioner. Menurut Brock & Madigan (1991) bahwa pada fase stasioner pada saat digunakan kondisi biakan rutin, akumulasi produk limbah, kekurangan nutrisi, perubahan pH, dan faktor lain yang tidak diketahui akan mendesak dan mengganggu biakan, mengakibatkan penurunan kecepatan pertumbuhan.

#### 4.5 Potensi Isolat Bakteri Proteolitik dan Bakteri Pemfermentasi

##### 4.5.1 Potensi Amilolitik dan Selulolitik Isolat Bakteri Pemfermentasi

Pengukuran potensi isolat pemfermentasi dilihat dengan mengukur aktivitas enzim amilolitik dan selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Untuk melihat profil aktivitas enzim pada isolat pemfermentasi dapat dilihat pada Gambar 12 dibawah ini.



Gambar 12. Perkembangan aktivitas Selulase dan Amilase isolat bakteri pemfermentasi pencernaan ikan Kerapu Bebek.

Dari kurva diatas dapat dilihat bahwa pada isolat bakteri pemfermentasi diukur aktivitas enzim amilase dan selulase. Pada pengukuran aktivitas enzim amilase digunakan substrat pati sedangkan pengukuran aktivitas enzim selulase digunakan substrat CMC. Dari pengukuran kedua aktivitas enzim tersebut didapatkan hasil bahwa aktivitas enzim amilase lebih tinggi di bandingkan aktivitas enzim selulase. Menurut Fogarti (1983) enzim  $\alpha$  amilase glukoamilase merupakan enzim yang memiliki peranan dalam proses perombakan karbohidrat atau pati.

Pada pengkuran aktivitas enzim amilase didapatkan kurva tertinggi pada jam ke 22 dengan nilai 0,969. Sedangkan pada pengukuran aktivitas enzim selulase didapatkan kurva tertinggi pada jam ke 20 dengan nilai 0,474. Tinggi nya aktivitas enzim amilase dibandingkan dengan selulase menunjukkan bahwa bakteri alami pada pencernaan ikan kerapu bebek lebih memiliki potensi yang tinggi dalam menghidrolisis pati. Menurut penelitian Kuzmina (1996) peningkatan proporsi pati kentang dalam pakan dari 10-90% yang diikuti penurunan proporsi tepung ikan akan meningkatkan aktivitas enzim maltase dan amilase pada ikan mas. Stickney dan Shumway (1974) menambahkan bahwa enzim selulase diproduksi oleh mikroflora pencernaan, yang dihubungkan dengan aktivitas selulase dalam pencernaan dengan selulase/bakteri selulolitik.

Kemampuan bakteri pemfermentasi yang diduga dari genus *Bacillus* dalam menghasilkan enzim amilase manunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi amilum atau pati. Sivaramakirshnan *et al.*, 2006 melaporkan *Bacillus* merupakan genus bakteri penghasil enzim amilase ekstraseluler terbesar. Beberapa spesies genus ini seperti *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, *B.lichinoformis*, *B.amiloquafacien* seringkali digunakan



untuk memproduksi enzim amilase secara komersial untuk berbagai keperluan. Hasil penelitian Furuichi (1988) menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase pada ikan karnivora lebih rendah dibandingkan dengan ikan omnivora dan herbivora. Dengan demikian, kemampuan ikan mencerna karbohidrat sangat rendah terutama pada ikan karnivora. Krogdahl *et al.*, (2005) juga menyatakan bahwa pada ikan herbivora aktivitas enzim amilase lebih tinggi dari pada aktivitas enzim protease dan lipase. Demikian juga aktivitas enzim protease dan lipase ikan omnivora dan karnivora lebih tinggi dari pada enzim amilase.

Proses kerja enzim dalam pencernaan ikan hampir semuanya sama. Enzim amilase dan lipase tidak hanya terdapat pada ikan herbivora saja, tetapi juga pada ikan karnivora namun konsentrasinya berbeda. Keberadaan enzim-enzim pencernaan berhubungan dengan makanan yang dikonsumsi. Helver (2002) menyatakan bahwa pada ikan herbivora aktivitas enzim amilase lebih tinggi dari pada protease dan lipase, demikian halnya ikan omnivora dan karnivora aktivitas enzim protease dan lipase lebih tinggi dari pada enzim amilase. Daya cerna ikan terhadap suatu makanan bervariasi dari spesies satu ke spesies yang lain.

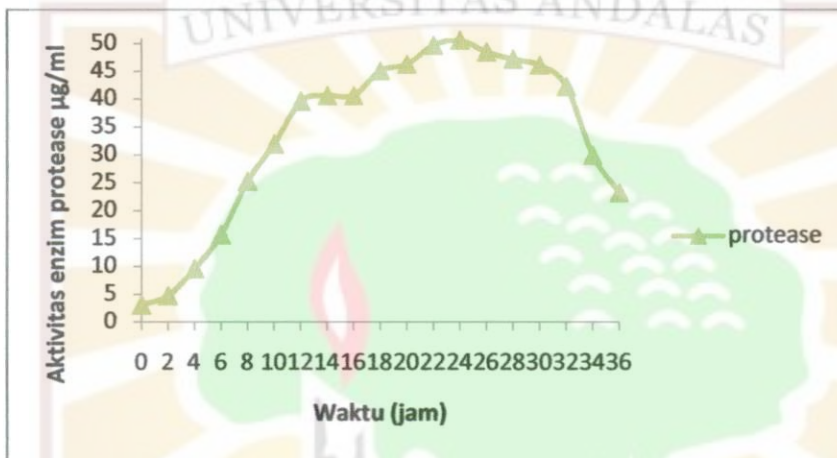
Kemampuan bakteri pemfermentasi dalam menghasilkan enzim selulase menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa. Carboxy methyl cellulose (CMC) adalah substrat yang digunakan dalam deteksi awal untuk screening enzim selulase khpencernaannya endoglukanase. Enzim selulase merupakan kelompok enzim glikosilhidrolase yang menghidrolisis oligosakarida dan polisakarida.

Laju reaksi enzim sangat dipengaruhi oleh adsorpsi substrat. Semakin banyak enzim yang dapat diserap maka semakin tinggi kecepatan hidrolisis enzim. Faktor yang mempengaruhi adsorpsi pada selulosa adalah sifat substrat,

kosentrasi enzim, perubahan struktur substrat selama hidrolisis, inaktivasi selulase oleh produk-produk hidrolisis (Irawadi, 1999, *cit.* Pairunan, 2009).

#### 4.5.2 Potensi Protease Isolat bakteri proteolitik

Pada isolat proteolitik dapat diukur potensi aktivitas enzim protease seperti yang terlihat pada Gambar 13 dibawah ini



Gambar 13. Profil perkembangan aktivitas enzim protease isolat bakteri proteolitik pencernaan ikan Kerapu Bebek.

Pengukuran enzim protease juga dilakukan dengan pencuplikan 2 jam selama 36 jam. Aktivitas enzim protease tertinggi terlihat pada jam ke 24 yaitu 50,66 µg/ml. Bakteri proteolitik dapat menghasilkan enzim protease karena kemampuan bakteri ini dalam mendegradasi protein yang ada pada substrat susu. Selain itu juga diperkirakan bahwa aktivitas enzim protease yang tinggi diakibatkan oleh kandungan protein yang tinggi pada pakan yang sering dimakan oleh ikan kerapu bebek ini. Hepher (1990) menyatakan bahwa kandungan protein pakan yang tinggi dikaitkan dengan kandungan selulase yang rendah umumnya meningkatkan aktivitas protease pada ikan rainbow trout.

Aktivitas protease mengalami penurunan pada jam ke- 26, dan penurunan drastis terjadi pada jam ke-34. Penurunan aktivitas protease berhubungan dengan



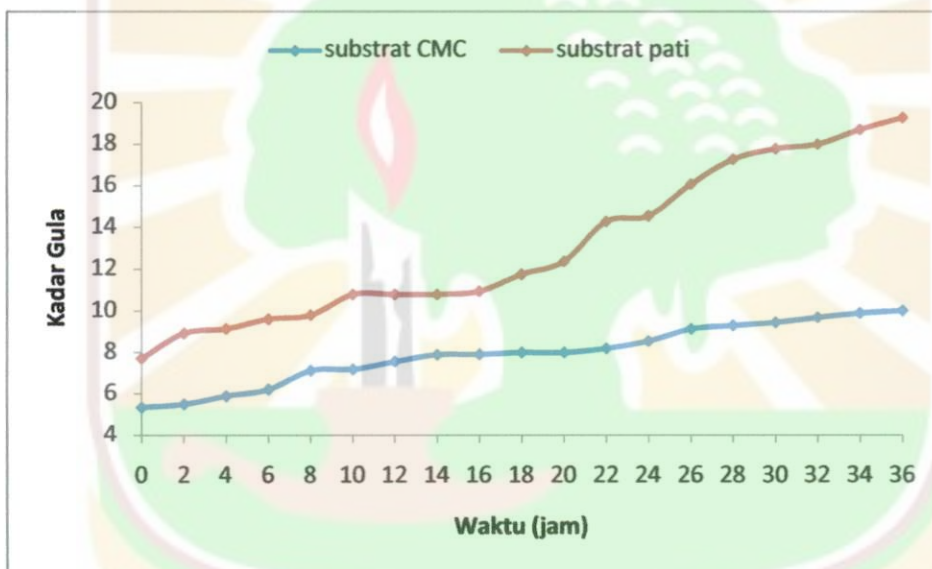
semakin berkurangnya kandungan protein susu pada substrat cair Skim karena telah digunakan pada aktivitas jam sebelumnya. Aktivitas enzim yang dihasilkan pada bakteri alami pencernaan ikan bergantung pada jenis pakan yang dimakan oleh ikan. Pencernaan pakan oleh bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek ini meliputi hidrolisis protein menjadi asam amino atau polipeptida sederhana, karbohidrat menjadi gula sederhana dan lipid menjadi gliserol dan asam lemak. Menurut Kuzmina (1996) bahwa kandungan nutrisi pakan berpengaruh terhadap aktivitas enzim pencernaan ikan. Zonneveld, *et al* (1991) juga menambahkan bahwa hidrolisis nutrisi makro dimungkinkan dengan adanya enzim pencernaan seperti protease, karboksilase, lipid dan selulase. Hasil penelitian Yusmarini *et al.*, (2009) menyatakan fermentasi susu kedelai dapat menghasilkan enzim protease yang akan menghidrolisis protein menjadi peptida yang mampu menurunkan kolesterol plasma. Hasil penelitian Bairagi, *et al.*, (2000) berhasil mengisolasi dua mikroba dari strain *Bacillus* yaitu *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* dari saluran pencernaan ikan mas dan ikan nila. Kedua jenis mikroba ini memproduksi enzim amilase, selulase, protease, dan lipase yang berperan penting dalam efisiensi pakan dalam saluran pencernaan.

Isolat bakteri proteolitik yang didapatkan diduga dari genus *Bacillus*. Hasil penelitian Murni (2004) menunjukkan bahwa penambahan bakteri probiotik *Bacillus sp* dalam pakan buatan mampu meningkatkan laju pertumbuhan ikan gurami, karena aktivitas enzim pencernaan meningkat, yaitu aktivitas enzim protease meningkat dari 0,55 menjadi 0,86 unit/menit/ml dan aktivitas enzim amilase meningkat dari 663,7 menjadi 851,8 unit/menit/ml. Menurut Fardiaz (1992) sebagian dari *Bacillus sp* mempunyai sifat proteolitik yang dapat mensekresikan enzim protease, sebagian mempunyai sifat lipolitik yang dapat

mensekresikan enzim lipase dan bersifat amilolitik yang dapat mensekresikan enzim amilase. Keberadaan enzim-enzim ini dapat membantu meningkatkan daya cerna ikan, sehingga penggunaan pakan lebih efisien.

#### 4.5.3 Kadar gula

Pengukuran kadar gula pada isolat pemfermentasi juga dilihat pada setiap pencuplikan 2 jam selama 36 jam. Kurva kadar glukosa dapat dilihat pada gambar 10 dibawah ini.



Gambar 14. Perkembangan kadar glukosa substrat CMC dan pati 1% selama pengujian aktivitas enzim bakteri pemfermentasi

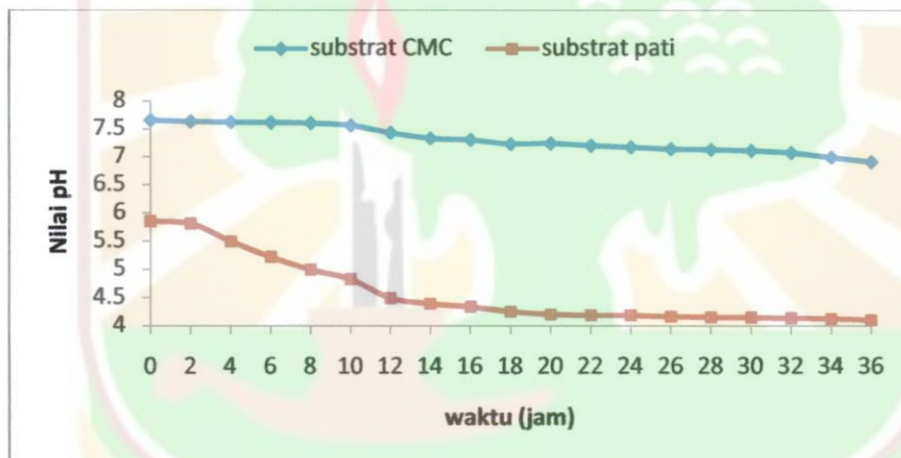
Dari kurva diatas dapat dilihat bahwa kadar gula pada substrat pati lebih tinggi dibandingkan kadar gula pada substrat CMC. Peningkatan kadar gula terjadi pada tiap jam setiap kali pencuplikan. Kadar gula pada substrat pati yang lebih tinggi dibandingkan kadar gula pada substrat CMC menandakan bahwa bakteri pemfermentasi yang lebih memiliki kemampuan dalam mendegradasi gula yang ada pada substat amilum atau pati menjadi gula yang lebih sederhana dari pada selulosa yang ada pada substrat CMC. Pemecahan molekul kompleks yang



ada pada pati terdiri dari amilosa dan amilopektin yang dihidrolisis oleh bakteri dengan bantuan enzim ekstraseluler agar mampu diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti glukosa. Kadar gula akan terus meningkat seiring dengan bertambahnya total bakteri yang dapat merubah molekul kompleks tersebut. Nilai pH juga semakin menurun, hal ini karena kemampuan bakteri pemfermentasi dalam menguraikan gula-gula yang ada menjadi gula yang lebih sederhana.

#### 4.5.4 Nilai pH

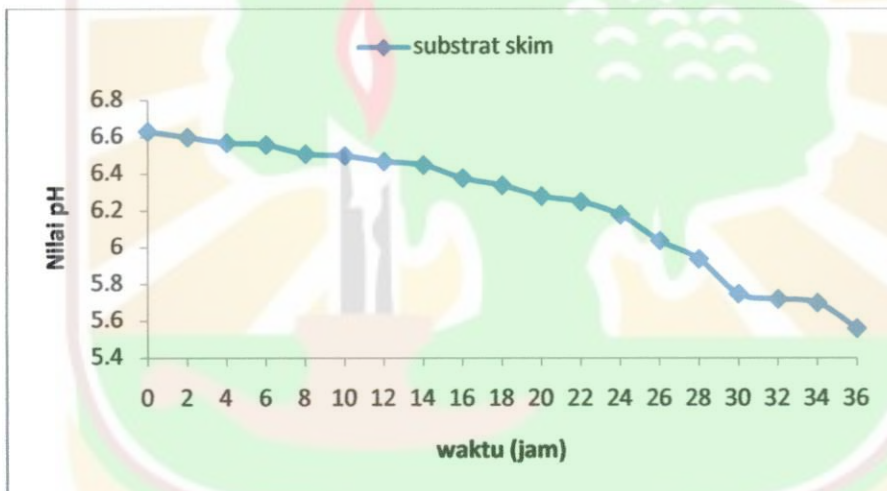
Hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Gambar 15 berikut:



Gambar 15. Perkembangan nilai pH substrat CMC dan pati 1% selama pengujian aktivitas enzim bakteri pemfermentasi

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa pH tertinggi terdapat pada substrat CMC yang rata-rata memiliki nilai pH 7. Namun pH pada substrat CMC ini tiap jamnya selalu mengalami penurunan nilai pH. pH pada substrat pati lebih memiliki nilai asam dibandingkan dengan substrat CMC. Rata-rata nilai pH pada substrat pati yaitu 4 yang berarti bahwa kondisi pH pada medium pati lebih bersifat asam, ini mengindikasikan bahwa bakteri pemfermentasi tahan terhadap kondisi asam lambung yang rata-rata memiliki pH 4. Nilai pH yang

selalu menurun tiap jam nya berbanding terbalik dengan nilai kadar gula yang selalu meningkat pada tiap jam nya. Hasil penelitian Saputro (2008) menyatakan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh genus *Bacillus* memiliki kisaran pH < 6 pada suhu 37-40 °C pada substrat tepung tapioka. Sivaramakrishnan et al., (2006) melaporkan bahwa spesies *Bacillus* mampu memproduksi enzim amilase pada suhu 37-60 °C dengan nilai pH kisaran 4,5-5,0. Perbedaan karakter suhu dan pH yang dimiliki enzim menunjukkan bahwa enzim bersifat pencernaan, tergantung spesies yang menghasilkannya.



Gambar 16. Perkembangan nilai pH substrat skim milk 1% selama pengujian aktivitas enzim protease

Perkembangan nilai pH pada substrat skim menunjukkan nilai rata-rata 5. Hal ini berarti bahwa pH pada substrat skim juga dalam kondisi asam. Nilai pH pada substrat skim setiap 2 jam pencuplikan selalu mengalami penurunan nilai, ini berarti bahwa aktivitas bakteri proteolitik yang ada dalam medium cair skim ini setiap jam nya melakukan perombakan substrat untuk aktivitas pertumbuhannya.



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang isolasi dan karakterisasi bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) sebagai kandidat probiotik pakan ikan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

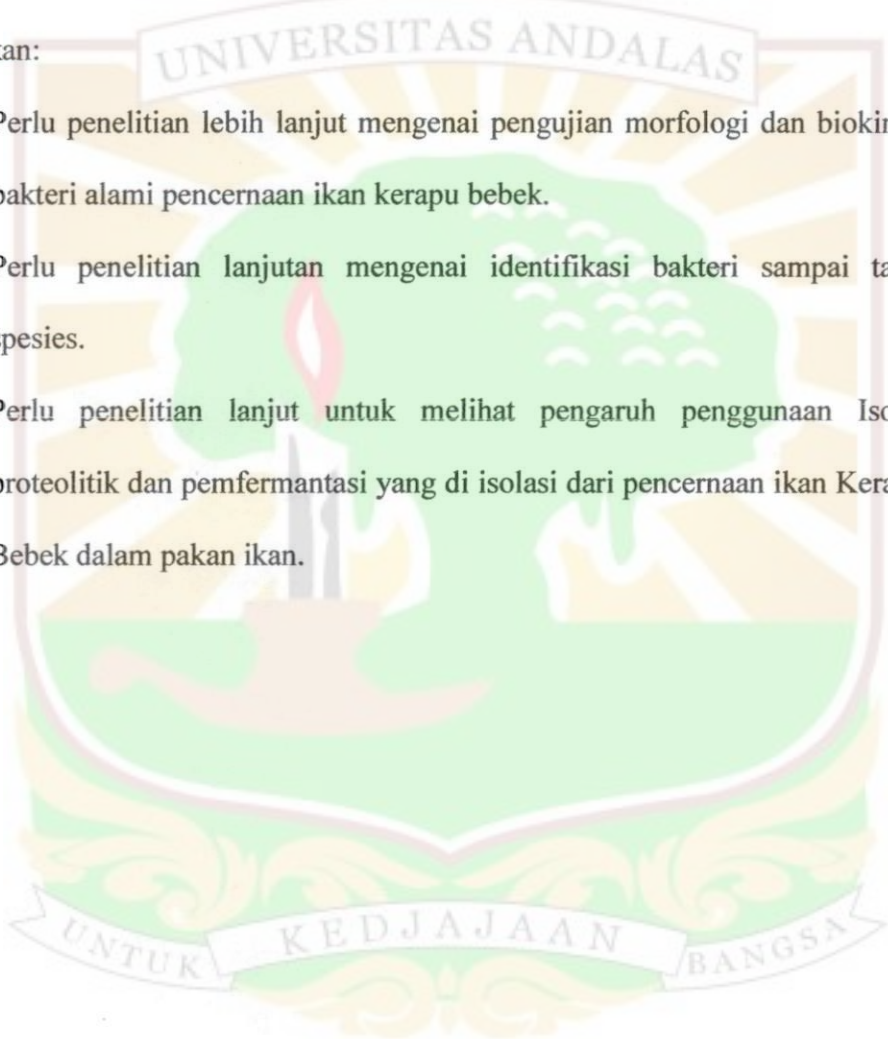
1. Didapatkan dua jenis isolat bakteri alami pencernaan ikan Kerapu bebek setelah dilakukan isolasi yaitu isolat bakteri proteolitik (dalam medium SMA) dan bakteri pemfermentasi (dalam medium GTA+CaCO<sub>3</sub>) yang proporsional nya 3:1.
2. Isolat bakteri proteolitik memiliki potensi sebagai kandidat probiotik dilihat dari besarnya indeks Proteolitik yang dihasilkannya dalam mendegradasi protein dalam medium SMA yaitu 11,5 dan tingginya aktivitas enzim protease yang dihasilkannya dalam medium cair Skim Milk 1% dengan pH rata-rata 5.
3. Isolat bakteri pemfermentasi memiliki Nilai IF yaitu 10,5 , nilai IA 9 dan IS 2. Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh isolat pemfermentasi yaitu aktivitas enzim amilase tertinggi terjadi pada jam ke-22 yaitu 0,969 dengan pH rata-rata 4 dan selulase tertinggi pada jam ke 20 dengan nilai 0,474 dengan pH rata-rata 7.
4. Isolat bakteri proteolitik diduga dari genus *Bacillus* dengan bentuk sel batang panjang ,Gram (+), katalase (+), motilitas (+), endospora (-), dan KOH (-). Isolat bakteri pemfermentasi juga diduga dari genus *Bacillus*

dengan bentuk sel batang pendek, Gram (+), katalase (+), motilitas (+), endospora (-), dan KOH (-).

## 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan ada beberapa hal yang dapat disarankan:

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai pengujian morfologi dan biokimia bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek.
2. Perlu penelitian lanjutan mengenai identifikasi bakteri sampai taraf spesies.
3. Perlu penelitian lanjut untuk melihat pengaruh penggunaan Isolat proteolitik dan pemfermentasi yang di isolasi dari pencernaan ikan Kerapu Bebek dalam pakan ikan.





## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, T., P.T. Imando, Muchari, A. Basyari, P. Suryoto, B. Slamet, Mayunar, R. Purba, S. Diani, S. Redjeki, A. Pranowo dan S. Murtiningsih. 1991. *Pedoman teknis operasional pembesaran ikan kerapu dalam karamba jaring apung*. Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai, Maros. 59p.
- Almeida P.C, I.L, Nantes, J. R. Chagas, C. C. A. Rizzi, A. F. Alario, E. Carmona, L. Juliano, H. B. Nader, I. L. S. Tersarior. 1983. Cathepsin B activity regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2) : 944-951.
- Amiruddin, H. 2008. *Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) Sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas*. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Bairagi, A., Sarkar, K., Sen, S., and ray, A.K. 2004. Evaluation of The nutritive value of *Leucoena leucocephala* Leaf Meal, Inoculated With Fish Intestinal Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in Formulated Diets for Rohu, *Labeo rohita* (hamilton) Fingerlings. *Aquaculture Research*, 35:436-446.
- Brock and Madigan. 1991. *Biology of microorganisms*. New jersey.
- Cholik, F., Artati, dan R. Arifudin. 2005. *Akuakultur Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa. Masyarakat Perikanan nusantara kerjasama dengan taman Akuarium Air Tawar*. Jakarta 415 hlm.
- Ernst, D.H., J.P. Bolte., S.S Nath. 2000. AquaFarm : Simulation and decision support formaquaculture facility desighn and management planning . *Aquacultural Engineering* 23,121-17
- Evalawati., M. Meiyana dan T.W. Aditya. 2001. *Biologi Kerapu, Pembesaran Kerapu Bebek dan Kerapu Macan di Keramba Jaring Apung*. Ditjenkan. BBL Lampung. Hal 3-6
- Fardiaz, S. 1987. *Fisiologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas IPB, Bogor.
- Fardiaz S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Kerjasama PAU Pangan dan Gizi IPB dengan Penerbit Gramedia Utama.
- Fauzy, I. A., I. Mokoginta dan D. Aniharto. 2008. Pemeliharaan Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) yang Diberi Pelet Ikan Rucah di Keramba Jaring Apung. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 7(1): 65-70 (2008)

- Felliatra., I . Efendi., dan E.Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia* 6(2): 75-80 2004
- Felliatra., Y. Fitria., dan Nursyirwarni. 2012. Antagonis Bakteri Probiotik Yang Diisolasi Dari Pencernaan Dan Lambung Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes Altivelis*) Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Perikanan dan Kelautan* 17,1 (2012) :16-25
- Fogarty, W. M. 1983. *Microbial enzymes and Biotechnology*. London: Applied Science , hlm 1-92.
- Fuller, R. 1987. A review, Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- Fuller, R. 1997. Probiotics 2, Application and Practical Aspect. Chapman & hall. London, 368 pp.
- Helver JE. 2002. *Fish Nutrition*. School of Fisheries University Washington. Seattle. Academia Press, INC. P 798.
- Hadioetomo, R.S. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT.Gramedia, Jakarta.
- Handayani, W. 2007. *Penambahan Beberapa Jenis Rempah Terhadap Keberadaan Mikroflora Ragi Tapai*. Skripsi Sarjana Biologi FMIPA, Universitas Andalas. Padang.
- Hemmstra, P.H and J.E. Randall. 1993. *FAO Species Catalogue*, Vol.16, Groupers of the world. FAO, Rome 382 P.pi.XXXI
- Hepher , B. 1990. *Nutrition of Pond Fishes*. New york : Cambridge University Press.
- Irianto, A. 2010. *Manfaat Probiotik Pada Akuakultur*. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Jamilah, I. 2011. *Penapisan Bacillus dan Karakterisasi Protease dan Amilase Ekstraseluler yang Dihasilkan untuk Degradasi Sisa Pakan pada Budi Daya Udang*. Thesis Doctor IPB. Bogor
- Jamilah, I., A. Meryandini, I. Rusmana, A. Suwanto, N.R. Mubarik. 2009. Activity Proteolytic and Amylolytic Enzymes From Bacillus spp. Isolated from Shrimp Ponds. *Journal Microbiology Indonesia*. 3 (2) : 67-71



- Kadri, S and P.J. Blyth The Aquasmart adaptive feeding system: a tool for studying the feeding patterns of cultured fish and optimizing fish farm production. In: Houlihan, D., Kiesling, A., Boujard, T.(Eds.), Voluntary Food Intake in Fish, P.15.
- Kim, S. K, P. J. Park, J. B. Kim, F. Shahidi. 2002. Purification and Characterization of the Collagenase from the Tissue of folefish, Novoden Modestrus. *Journal of Biochemistry and Molekular Biology* 35(2):165-171
- Krogdahl A, Hemre GI, Mommse TP. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorpton in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11; 103–122
- Kusmina, W. 1996. Influence of Age on Digestive Enzme Activit in Some Freshwater Teleostei. *Aquaculture*, 148:25-37.
- Laining, A, 2004. *Penampilan pemberian pakan Buatan Dalam Penggelondongan Kerapu Bebek*. Warta Penelitian Perikanan Volume 10, Nomor 1. Pusat Riset Perikanan Budidaya, jakarta.
- Laining A., & Rachmansyah, 2002, Komposisi Nutrisi Beberapa Bahan Baku Lokal dan Nilai Kecernaan Proteinnya pada Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptis altivelis*), *J.Pen. Per. Indonesia, Edisi Akuakultur*. 8(2): 45-51.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta: Manajemen PT. Raja Grafindo Persada.
- Lee, P.G., 1995. A. review of automated control systems for aquaculture and desighn criteria for their implementation. *Aquacultural Engineering* 14,205-227.
- Macey, B.M., V.E. Coyne, 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245 : 249–261.
- Marlina. 2009. Isolasi bakteri patogen *Escherichia coli* O157:H7 pada sampel seafood dan deteksi gena flich7 secara PCR. *Majalah Farmasi Indonesia*, 20(2), 73 – 76, 2009.
- Middelbeek EJ, Jenkins RO, Drijver JS- de Haas. 1992b. Nutrition and Cultivation of Microorganisms. In: Cartledge TG, editor. *In Vitro Cultivation of Microorganisms*. Oxford: Butterworth - Heinemann. hlm 21-51.

- Middelbeek EJ, Jenkins RO, Drijver JS - de Haas. 1992a. Growth in Batch Culture. In: Cartledge TG, editor. *In Vitro Cultivation of Microorganisms*. Oxford: Butterworth - Heinemann. hlm 79-106.
- Mukholifah. 2010. *Isolasi Bakteri Dari Ikan Sebagai Kandidat Probiotik Akuakultur*. Tesis. Pascasarjana Biologi. ITS. Surabaya.
- Murjdani, M. 2007. *Problem Solving penyakit di pembenihan udang*. Buku panduan, Seminar Nasional Udang I. Masyarakat Akuakultur Indonesia. Jakarta, 11 pp.
- Murni 2004. Pengaruh Penambahan Bakteri Probiotik *Bacillus sp* Dalam Pakan Buatan Terhadap Aktivitas Enzim Pencernaan, Efisiensi Pakan dan Pertumbuhan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy Lac.*) [Tesis]. Pascasarjana. IPB. Bogor. 47 halaman.
- Nugroho, V. 2012. *Manfaat teknologi Probiotik untuk budidaya ikan dan udang*. <http://www.facebook.com/notes/vicko-nugroho-ber-tobat/manfaat-teknologi-probiotik-untuk-budidaya-ikan-dan-udang>. Diunduh 3 Agustus 2012.
- Nursyirwanil., Asmara, W. Wahyuni, H dan Triyanto. 2011. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Pencernaan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Potensinya Sebagai Antivibrio. *Jurnal ilmu Kelautan*. Vol. 16 (2) 70-77.
- Nybakken. J. W. 1988. *Biologi Laut*. Suatu Pendekatan Ekologis. PT Gramedia. Jakarta.
- Orejana, F. M. 1983. Fermented Fish products. Di dalam *Handbook of tropical foods* (Chan, H. T. Ad). Marcel Dekker Inc. New York. p. 255-295
- Pairunan, V.I. 2009. *Karakteristik Fementasi Pulp Kakao Dalam Produksi Asam Asetat Menggunakan Bioreaktor*. Thesis Magister Sains IPB. Bogor
- Papandroulakis, P., Divanach, P. Anastasiadis, M. Kentouri. 2002. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Journal: Aquaculture International - AQUACULT INT*, vol. 9, no. 3, pp. 205-216.
- Pelczar, M, J. And R. D. Reid. 1958. *Microbiology*. Mc Graw Hill Book Company. Inc. New York. Toronto. London.

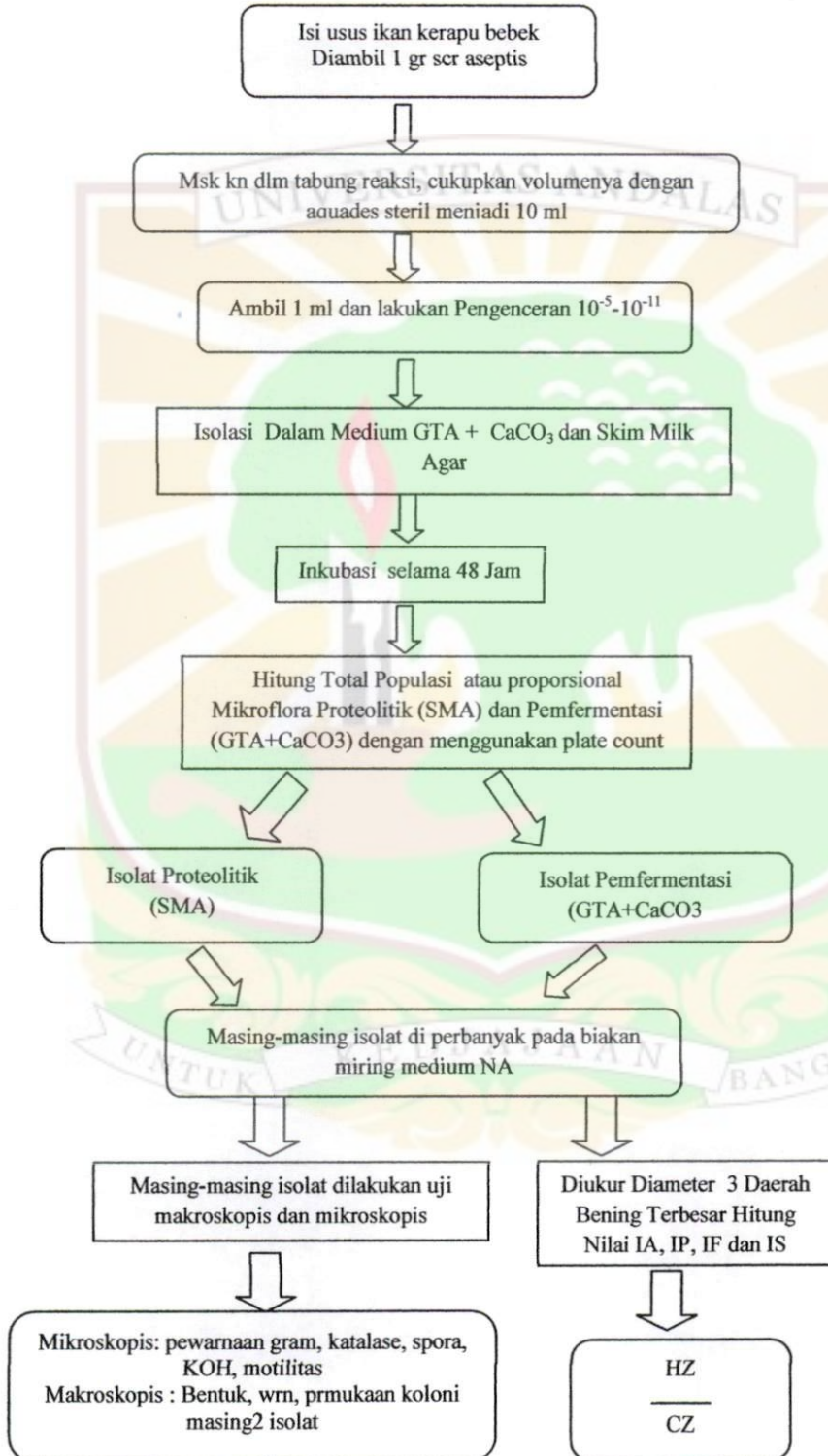


- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi* 2. Penerbit UI Press, Jakarta. hal. 461-467.
- Periadnadi dan Nurmiati. 2010. *Keberadaan dan Isolasi Mikroflora dalam Buah Tropis*. Universitas Andalas, Padang. Unpublish.
- Pobersonic. 2011. *Pertumbuhan Ikan Kerapu Bebek Di Lampung*. <http://pobersonaibaho.wordpress.com/2011/02/09/resume-pertumbuhan-ikan-kerapu-bebek-di-lampung/>. Diunduh 30 Juni 2012.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Purwandhani, S.N, Suladra, M, Rahayu, S. 2007. *Stabilitas Thermal Agenia Probiotik L. acidophillus Snp 2 Terenkapsulasi Metode Ekstrusi Dan Emulsi*. Seminar Nasional Teknologi. Yogyakarta.
- Rahayu, E.S dan Margino. 1997. *Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi*. Materi Workshop 13-14 Juni 1997. Pusat Antar universitas. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta .
- Rachmadi, A.T. 2008. Peranan Bakteri Pencernaan Asal Ikan Nila GIFT Dalam Menghambat Pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* BT-02 [skripsi]. FMIPA, IPB, Bogor.
- Sa'id EG. 1987. *Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Penerbit PT Mediyatama Sarana Perkasa. 317 hlm.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. & Lee Y.K. 1999. Probiotics: how should be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10:107 – 110
- Saputro, M. N. 2008. Karakterisasi  $\alpha$  Amilase dan Glukoamilase dari Bakteri Proteolitik Asal Pencernaan Ikan Nila GIFT. *Thesis*. Departement Biologi, FMIPA. ITB, Bogor.
- Schmidt and Haensch. 2006. *Refractometer*. <http://www.Schmidt-Haensch.com>.
- Schlegel, H.G dan Schmidt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Gadjah Mada University Press. Jogjakarta.
- Sivaramakrishnan. 2006.  $\alpha$  Amilase From Microbial Sources-an Overview on Recent Developments. *Food Technol Biotechnol*. 44: 173-184.
- Slamet, B., Tridjoko dan Priyono. A. 2010. *Optimalisasi Pembenihan Ikan Kerapu Bebek (Cromileptes Altivelis) Melalui Intensifikasi Pemeliharaan Benih Dan Pemijahan*. Kementrian laut dan Perikanan.

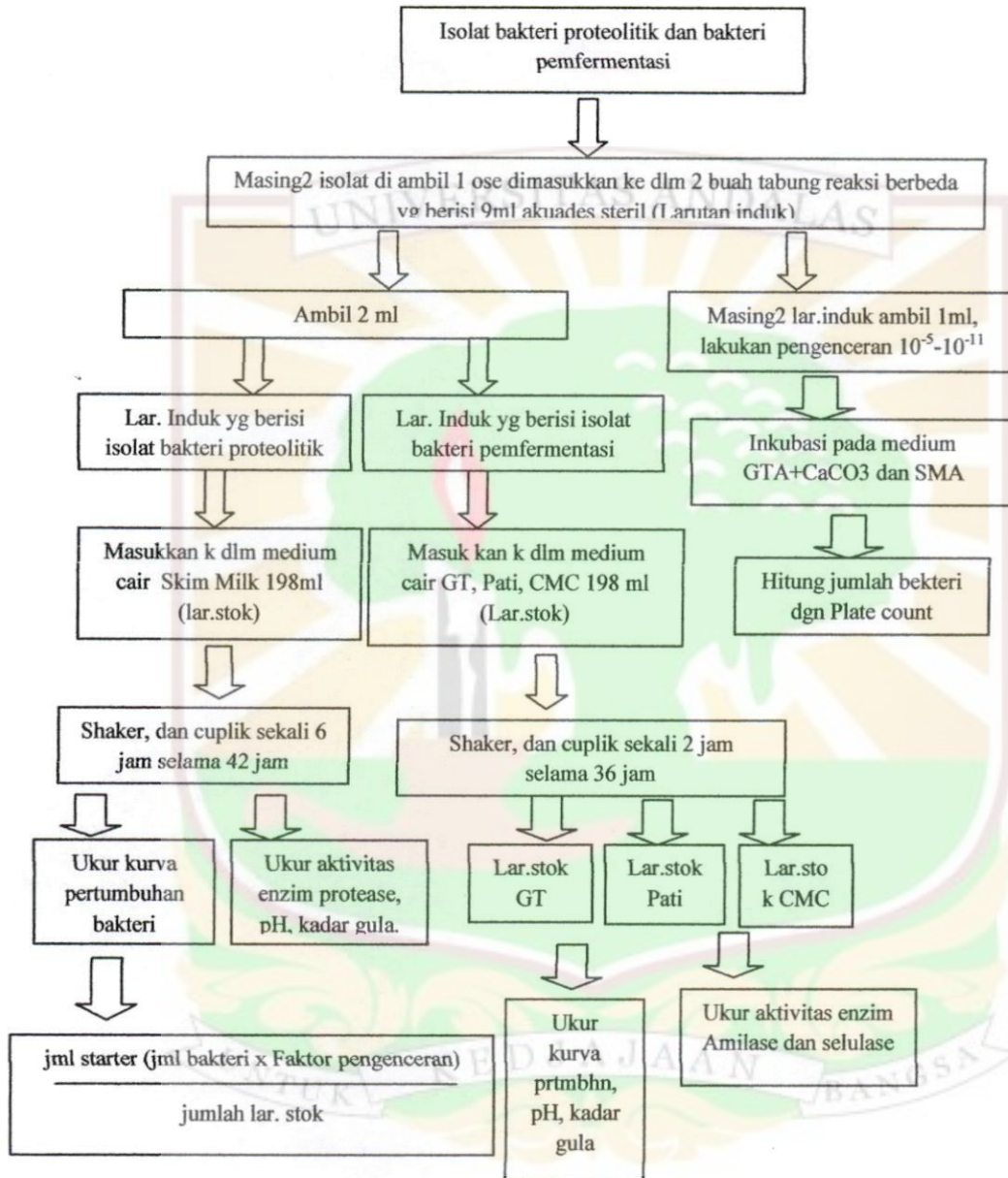
- Soemarjati, W et al., 2008. *Rekayasa Automatic Feeder Sederhana Untuk Meningkatkan Kinerja Pendederan Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Balai Budidaya Air Payau Situbondo.
- Soharsono. 2010. *Fisiologi Ternak*. Padjajaran. Bandung.
- Stellmach, B. 1988. Bestimmungsmethoden enzyme. Dietrich Steinkopff Verlag. Darmstadt.
- Stickney, R.R and S.E, Shumway. (1974) Occurrence of cellulase activity in the stomachs of fish. *Journal of Fish Biology*, 6:779-790.
- Tampubolon, G.H. dan E . Mulyadi. 1989. *Sinopsis Kerapu di Perairan Indonesia*. Balitbangkan, Semarang.
- Verschere, L. Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64: 655-671
- Waluyo, L. 2007. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhamadiyah. Malang.
- Ward, O. P. 1983. Proteinase. Di dalam *Microbial Enzyme and Biotechnology*. W. M. Fogarty. *Applied Science Publisher*. New York.
- Widagdo, P. 2011. *Aplikasi Probiotik, Prebiotik, dan Simbiotik Melalui Pakan Pada Udang Vaname Litopenaeus vannamei yang Di Infeksi Bakteri Vibrio harveyi*. Departemen Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut pertanian Bogor. Bogor.
- Yusmarini., I. Retno., U. Tyas, dan M. Yustinus. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia* 12(1), Oktober 2009: 28-33
- Zonneveld, N, E. A. Huisman dan J.H. Boon. 1991. *Prinsip-prinsip Budidaya Ikan*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 318 hal.



Lampiran 1. Skema Kerja Isolasi bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek



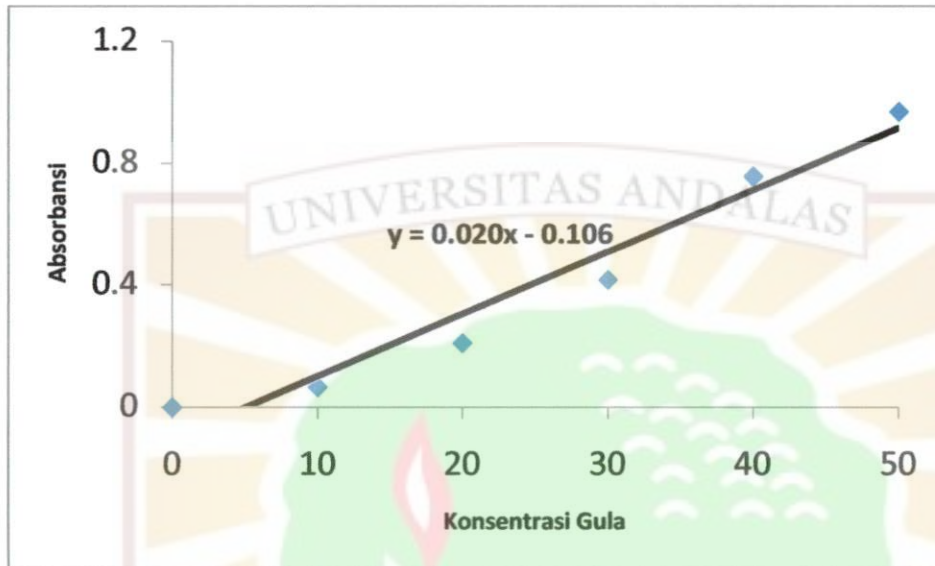
Lampiran 2. Skema karakterisasi kurva pertumbuhan bakteri





## Lampiran 3.

## Kurva standar glukosa



## Lampiran 4.

## Nilai pH substrat CMC, pati, dan Skim

jam	substrat CMC	substrat pati	substrat skim
0	7,66	5,85	6,63
2	7,64	5,81	6,6
4	7,63	5,5	6,57
6	7,62	5,22	6,56
8	7,61	5	6,51
10	7,57	4,83	6,5
12	7,44	4,5	6,47
14	7,34	4,4	6,45
16	7,31	4,34	6,38
18	7,24	4,26	6,34
20	7,25	4,21	6,28
22	7,21	4,19	6,25
24	7,18	4,19	6,18
26	7,15	4,17	6,04
28	7,14	4,16	5,94
30	7,12	4,15	5,75

32	7,08	4,14	5,72
34	7	4,13	5,7
36	6,92	4,11	5,56

#### Lampiran 5.

Aktivitas enzim selulase, amilase, dan protease

jam	selulosa	amilase	protease
0	0,176	0,191	3,13
2	0,18	0,208	4,8
4	0,184	0,286	9,66
6	0,2	0,298	15,8
8	0,215	0,354	25,4
10	0,236	0,362	32
12	0,289	0,405	39,66
14	0,347	0,431	40,66
16	0,399	0,64	40,67
18	0,441	0,708	45,13
20	0,474	0,798	46,33
22	0,416	0,969	49,73
24	0,39	0,649	50,66
26	0,367	0,644	48,53
28	0,357	0,614	47,2
30	0,339	0,548	46,13
32	0,317	0,529	42,33
34	0,277	0,49	30
36	0,246	0,467	23,33

#### Lampiran 6.

Kadar gula

jam	substrat CMC	substrat pati
0	5,35	7,72
2	5,51	8,92
4	5,89	9,14
6	6,21	9,6
8	7,13	9,8



10	7,2	10,8
12	7,57	10,8
14	7,9	10,8
16	7,91	10,95
18	8	11,76
20	8	12,38
22	8,2	14,29
24	8,55	14,56
26	9,13	16,09
28	9,31	17,28
30	9,46	17,79
32	9,7	18,02
34	9,91	18,72
36	10,02	19,29

#### Lampiran 7.

Nilai total bakteri alami pencernaan ikan kerapu bebek (CFU/ml)

No.	Waktu (jam)	Bakteri Proteolitik	Bakteri Pemfermentasi
1	0	$24 \times 10^6$	$44 \times 10^6$
2	6	$121 \times 10^6$	$84 \times 10^6$
3	12	$220 \times 10^6$	$99 \times 10^6$
4	18	$208 \times 10^7$	$57 \times 10^7$
5	24	$57 \times 10^{11}$	$42 \times 10^{10}$
6	30	$58 \times 10^{10}$	$41 \times 10^{11}$
7	36	$74 \times 10^9$	$9 \times 10^{10}$
8	42	$25 \times 10^9$	$7 \times 10^9$

#### Lampiran 8.

Log kurva pertumbuhan

Waktu (jam)	Bakteri Proteolitik	Bakteri Pemfermentasi
0	7,38	7,64

## **BIODATA ALUMNI**

1. Nama : Dian Maya Sari
2. Tahun Masuk/NIM : 2011/1121208013
3. Jurusan/Prodi/Jenjang Program : Biologi/Biologi/S2
4. IPK/Predikat Kelulusan : 3,59/Sangat Memuaskan
5. Jenis Kelamin : Perempuan
6. Tempat/Tanggal Lahir : Salido/08 Agustus 1987
7. Negeri Asal : Salido kec. IV jurai pesisir selatan
8. Universitas Asal : Universitas Negeri Padang
9. Agama : Islam
10. Tanggal Wisuda : 1 Juni 2013
11. Lama Studi : 1 Tahun 8 Bulan
12. Email : dianmayasari@gmail.com
13. Alamat setelah Wisuda : Jln. Jenderal Sudirman No. 280 Sago Painan Kec. IV  
Jurai Pesisir Selatan
14. No. Telp./HP : 085263829826
15. Nama Orang Tua : Yunardi
16. Alamat Orang Tua : Jln. Jenderal Sudirman No. 280 Sago Painan Kec. IV  
Jurai Pesisir Selatan
17. Pekerjaan Orang Tua : Pegawai Negeri Sipil
18. a. Jumlah Bersaudara : 4  
b. Anak ke : 3
19. Saran-saran

Padang, Juli 2013

Wisudawati

Dian Maya Sari

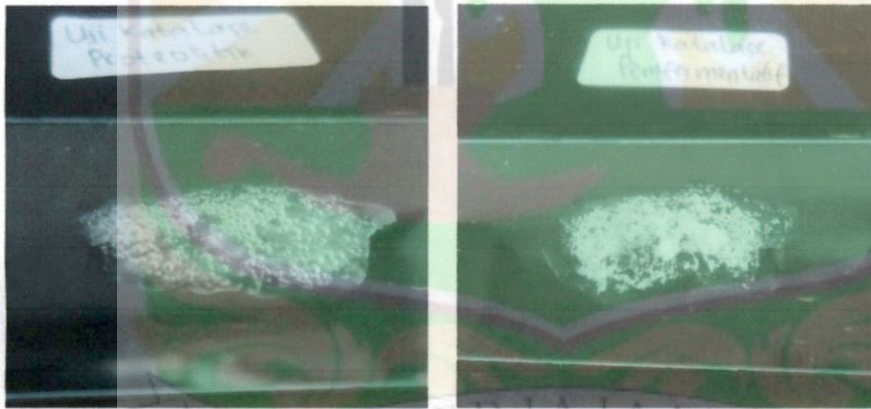


6	8,08	7,92
12	8,34	7,99
18	9,32	8,75
24	12,75	11,62
30	11,76	12,61
36	10,86	10,95
42	10,39	9,84

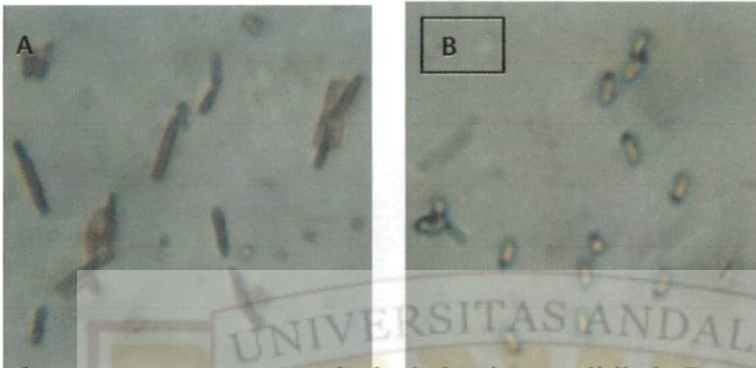
Lampiran 9.

indeks	koloni	zona bening	rata-rata
IA (Indeks amilase)	0,1	0,9	9
IF (Indeks fermentatif)	0,2	2,1	10,5
IS (Indeks selulolitik)	0,1	0,2	2
IP (Indeks Proteolitik)	0,2	2,3	11,5

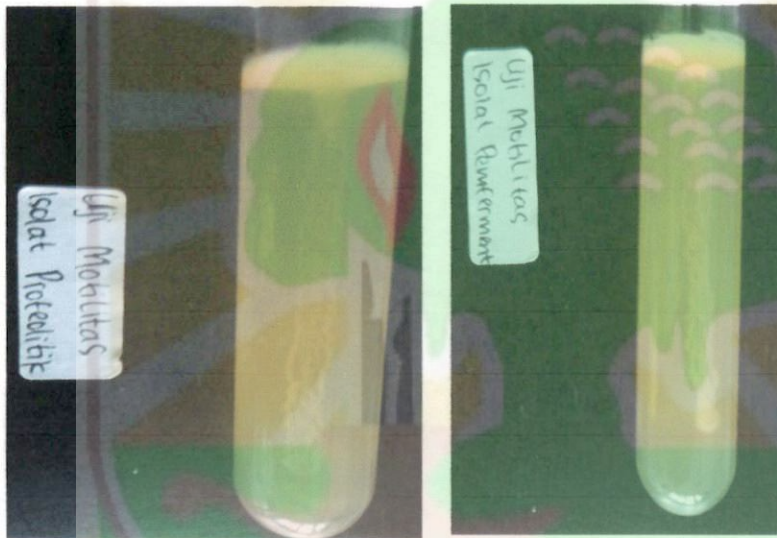
Lampiran 10. Foto-foto uji karakteristik bakteri alami pencernaan ikan Kerapu Bebek



uji Katalase isolat bakteri proteolitik, b. Uji katalase isolat pemfermentasi



Gambar .a. pewarnaan spora isolat bakteri proteolitik, b. Pewarnaan spora bakteri pemfermentasi



Gambar . a. Uji motilitas isolat proteolitik, b. Uji motilitas isolat pemfermentasi



Gambar . a. Uji KOH Isolat Bakteri Proteolitik, b. Uji KOH Isolat Pemfermentasi



## **BIODATA ALUMNI**

1. Nama : Dian Maya Sari
2. Tahun Masuk/NIM : 2011/1121208013
3. Jurusan/Prodi/Jenjang Program : Biologi/Biologi/S2
4. IPK/Predikat Kelulusan : 3,59/Sangat Memuaskan
5. Jenis Kelamin : Perempuan
6. Tempat/Tanggal Lahir : Salido/08 Agustus 1987
7. Negeri Asal : Salido kec. IV jurai pesisir selatan
8. Universitas Asal : Universitas Negeri Padang
9. Agama : Islam
10. Tanggal Wisuda : 1 Juni 2013
11. Lama Studi : 1 Tahun 8 Bulan
12. Email : dianmayasari@gmail.com
13. Alamat setelah Wisuda : Jln. Jenderal Sudirman No. 280 Sago Painan Kec. IV  
Jurai Pesisir Selatan
14. No. Telp./HP : 085263829826
15. Nama Orang Tua : Yunardi
16. Alamat Orang Tua : Jln. Jenderal Sudirman No. 280 Sago Painan Kec. IV  
Jurai Pesisir Selatan
17. Pekerjaan Orang Tua : Pegawai Negeri Sipil
18. a. Jumlah Bersaudara : 4  
b. Anak ke : 3
19. Saran-saran : -

Padang, Juli 2013

Wisudawati



Dian Maya Sari